



STRUCTURES ET MECANISMES DE FORMATION DE COMPLEXES POLYELECTROLYTE-PROTEINE

Jérémie Gummel

► To cite this version:

Jérémie Gummel. STRUCTURES ET MECANISMES DE FORMATION DE COMPLEXES POLYELECTROLYTE-PROTEINE. Analyse de données, Statistiques et Probabilités [physics.data-an]. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. Français. NNT : . tel-00120315

HAL Id: tel-00120315

<https://theses.hal.science/tel-00120315>

Submitted on 14 Dec 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE D'ORSAY
(PARIS-SUD 11)**

Ecole doctorale physico-chimie du sud de Paris

présentée par

Jérémie GUMMEL

pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Paris-Sud 11

**STRUCTURES ET MECANISMES DE
FORMATION DE COMPLEXES
POLYELECTROLYTE-PROTEINE**

Thèse soutenue le 9 octobre 2006 devant le jury composé de :

Dominique Langevin	Professeur, Université Paris-Sud 11	<i>Présidente</i>
Christian Sanchez	Maître de conférence, INPL Nancy	<i>Rapporteur</i>
Christophe Tribet	Maître de conférence, ESPCI Paris	<i>Rapporteur</i>
François Boué	Directeur de recherche, CNRS Saclay	<i>Directeur de thèse</i>
Per Linse	Professeur, Université de Lund Suède	<i>Examineur</i>
Michel Rawiso	Directeur de recherche, ICS Strasbourg	<i>Examineur</i>

Remerciements

Ma thèse s'est déroulée au Laboratoire Léon Brillouin du centre CEA de Saclay. Je tiens à remercier Pierre Monceau et Philippe Mangin successivement directeurs du laboratoire pour l'opportunité qu'ils m'ont offert de travailler dans leur laboratoire. De même je remercie également les adjoints de direction lors de ces trois années Alain Menelle, Michel Alba et Susanna Gota-Goldman pour m'avoir donné les moyens d'effectuer mes travaux.

Concernant la thèse en elle-même, mes remerciements les plus chaleureux vont à mes encadrants. En premier lieu François Boué qui m'a accueilli sans me connaître et m'a ainsi offert l'occasion de faire mes preuves. Tout au long de ces trois années il a suivi mon travail avec attention et m'a permis de m'ouvrir au monde de la recherche. De plus nous avons partagé de très agréables moments hors science qui resteront dans ma mémoire. Je tiens également à remercier Fabrice Cousin, mon co-encadrant, qui a suivi l'évolution de mes travaux au jour le jour. Son apport à ce travail fut très important, il a su m'ouvrir les yeux sur des points importants et son aide a été cruciale dans l'aboutissement des différents aspects de l'étude.

Beaucoup d'autres personnes ont permis à cette thèse d'aboutir en me permettant d'accéder à leur laboratoire et en participant activement à des expériences. Je tiens ici à les remercier. Il s'agit (par ordre chronologique d'apparition) de : Jorg Haug, local contact sur V4 au HMI à Berlin ; Bruno Demé, local contact sur D11 et D22 à l'ILL à Grenoble ; Monique Axelos (Directrice) et Dominique Guibert (Technicien) de l'INRA de Nantes pour les expériences de zéta-métrie ; Jean-Marc Verbavatz du LTMD CEA Saclay pour les clichés de TEM après cryofracture ; Christelle Cassan et Sophie Combet-Jeancenet du LLB pour les tests d'activité de la protéine.

Une grande reconnaissance va à Christian Sanchez et Christophe Tribet qui ont accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit ; leurs commentaires pertinents m'ont donné une nouvelle vision de mon travail. Je remercie également Dominique Langevin qui a présidé le jury de soutenance, Per Linse qui s'est déplacé de Suède et enfin Michel Rawiso avec qui j'ai toujours eu plaisir à converser de sciences et d'autres thèmes.

J'ai pu côtoyer au cours de ces trois années passées au LLB un grand nombre de personnes au gré des flux de thésards et autres stagiaires, en plus des permanents du laboratoire.

En premier lieu je tiens à remercier Abdeslam qui m'a mis en contact avec François par le biais du réseau messin (à savoir Karim que je remercie également). Je ne le connaissais pas avant de faire ma thèse et il m'a accueilli comme un frère et ce dès mon entretien. Il a ensuite toujours été là et pour ça il a ma plus grande reconnaissance. Dès mon arrivée au laboratoire, j'ai pu également faire la connaissance de Sandra et avoir pu la côtoyer durant près de deux ans restera une joie pour moi. De même j'ai eu la joie de rencontrer Jérôme, avec qui j'ai

partagé de bons moments. Sa présence à Orsay fut courte mais intense. Je tiens également à exprimer toute mon amitié à Karine L. qui a apporté sa joie de vivre au laboratoire et avec qui j'ai pu partager mon goût de la musique et de l'art contemporain. Je salue Marie-Sousai et Gabriel, nos amis déplieurs de protéine. Ce fut également agréable de les connaître et de partager café et autre thé. Une pensée va également à Vania avec qui il faisait toujours bon discuter, son humour et son flegme devant les épreuves étaient pour moi source d'inspiration. Une autre rencontre formidable fut Camila avec qui j'ai pu partager d'excellents moments. Je tiens d'ailleurs à la remercier pour son esprit sportif car elle a soutenu les Bleus en finale alors qu'ils avaient donné une leçon de football aux auriverde en quarts. D'ailleurs à ce propos qu'aurais-je fait sans Sébastien, mon seul interlocuteur footballistique à même de commenter avec moi les résultats du week-end ? Beaucoup d'autres personnes sont passés au laboratoire et j'ai une pensée pour eux : Odile, Karine L.B., Isabelle, Sophie, Olivier, Christelle, Amélie, Telma, Clémence et d'autres que j'oublie. Enfin je remercie plus particulièrement Amaury qui fut stagiaire sur mon sujet et dont la discrétion n'avait d'égal que l'efficacité.

J'ai également eu un grand plaisir à travailler au milieu des nombreux chercheurs du laboratoire. Je pense notamment à Jean-Marc et son humour sans limites, Sophie et sa grande gentillesse même si elle a refusé d'appeler son fils Thorsten, Géraldine et ses pommes, et je n'oublie pas non plus Lay-Teng, Stéphane, Julian, Didier, Juan, Annie, Jacques, Alain, José, Marie-Claire, Sylvain D. et Sylvain R avec qui j'ai partagé cafés et discussions informelles.

En dernier lieu je tiens à exprimer toute mon affection aux personnes qui, si elles n'ont pas été impliquées dans ces trois années de thèse, comptent beaucoup à mes yeux . En particulier (écrire leurs prénoms plutôt que leur surnom est une sensation très étrange) : Etienne, Adèle, Olivier, Emilie, Anthony, Alexis, Marion, Yannick, Tony, Julie, David et Amandine. A ceux-là je tiens également à associer les actuels ou ex mosellans : François-Xavier, Céline, Sébastien, Audrey, Emmanuelle, Yessine, Thomas, Emmanuel, Jérémie, Stéphanie, Kevin, Christian, Raphaël et Vivien.

Et pour finir je salue toutes les personnes que j'aurai oubliées (mais pas par dessein).

Enfin je remercie ici mes parents, ma soeur et toute ma famille pour leur soutien indéfectible tout au long des années. Sans les efforts de mes parents en particulier, rien de ce que j'ai accompli n'aurait été possible. Je leur témoigne ici tout mon amour.

Table des matières

1	Introduction	7
2	Les polyélectrolytes, les protéines et les assemblages formés	11
2.1	Les polyélectrolytes	11
2.1.1	Conformation des chaînes	12
2.1.2	La longueur de persistance	14
2.1.3	Le polystyrènesulfonate	16
2.2	Les protéines	18
2.2.1	Généralités	18
2.2.2	Le lysozyme	19
2.3	Les complexes	22
2.3.1	Les forces mises en jeu lors de la complexation	23
2.3.2	Les structures observées	25
2.3.3	Les applications des assemblages polyélectrolyte-protéine	30
3	La Diffusion de Neutrons aux Petits Angles	33
3.1	Le neutron	33
3.2	L'interaction neutron-matière	34
3.3	Le contraste	36
3.3.1	Notion de contraste	36
3.3.2	Variation de contraste	37
3.4	Mesure et traitement des données	37
3.4.1	Spectromètres de DNPA	37
3.4.2	Traitement des données	40
3.5	L'intensité diffusée	41
3.5.1	Facteur de forme : $P(q)$	41
3.5.2	Facteur de structure : $S(q)$	43
3.5.3	Signal total	43

3.6	Diffusion aux petits angles de solutions d'objets composants le mélange . . .	44
3.6.1	Le lysozyme	44
3.6.2	Le PSSNa	46
4	Structures des complexes et conformation des macromolécules : trois situations bien différentes	51
4.1	Echantillons turbides et limpides : deux structures distinctes	52
4.1.1	Caractérisation visuelle	52
4.1.2	Deux interactions différentes : caractérisation par DNPA	60
4.1.3	Zone limpide : Une dénaturation inédite	63
4.2	Echantillons turbides : du réseau réticulé aux globules denses	67
4.2.1	Deux comportements rhéologiques distincts	67
4.2.2	Deux assemblages distincts : caractérisation par DNPA	69
4.2.3	Conformation d'une chaîne dans le complexe : vers la compréhension de la transition gel-liquide	76
4.2.4	Evolution temporelle	86
4.3	Résumé	87
5	Régime de globules denses (1) : caractérisation fine des structures	91
5.1	Résultats de DNPA et dosage des espèces libres	92
5.1.1	Courbes expérimentales de Diffusion de Neutrons aux Petits Angles .	92
5.1.2	Dosages par spectroscopie UV	95
5.2	Analyse des spectres DNPA	98
5.2.1	Signal du lysozyme (solvant D ₂ O)	98
5.2.2	Signal des chaînes de PSS (Solvant D ₂ O/H ₂ O)	104
5.2.3	Fraction volumique interne et rapport de charge des complexes primaires	109
5.3	Complexes primaires	109
5.4	Localisation des contre-ions	111
5.4.1	Concept de l'expérience	111
5.4.2	De Na ⁺ à TAM ⁺ : une même structure	112
5.4.3	Globules sans couronnes : délocalisation des contre-ions	114
5.4.4	Globules avec couronnes : localisation des contre-ions et ajustement du signal	115
5.5	Structure à grande échelle	116
5.5.1	Cryo-TEM	117
5.5.2	Discussion sur l'agrégation à grande échelle (inter globule)	123
5.6	Résumé	124

6 Régime de globules denses (2) : les interactions électrostatiques comme pilote de la structure	127
6.1 Variation de la densité de charge sur les objets : résultats de DNPA	128
6.1.1 Variation de la densité de charges sur la protéine : variation du pH	128
6.1.2 Variation de la densité de charge sur le polyélectrolyte : sulfonation partielle	135
6.1.3 Essai avec une autre protéine	138
6.2 Charge des complexes	139
6.2.1 Charge interne des complexes à partir des mesures de DNPA	139
6.2.2 Charge effective des complexes	141
6.3 Evolution de la taille des complexes	146
6.3.1 Effet du rapport de charge introduit	146
6.3.2 Effet de la concentration totale	149
6.4 Compacité et accessibilité du coeur des complexes primaires	152
6.4.1 Compacité des complexes primaires en fonction des conditions initiales	153
6.4.2 La dénaturation comme sonde	154
6.5 La longueur de Debye comme paramètre principal de la formation des complexes	157
6.6 Résumé	162
7 Modulation des interactions électrostatiques par la force ionique	165
7.1 Structure obtenue en fonction de la force ionique initiale	166
7.1.1 Pour des chaînes longues	167
7.1.2 Pour des chaînes courtes	169
7.1.3 Trois structures accessibles par la salinité	171
7.2 Etude détaillée de la transition gel-globule	171
7.2.1 Par la force ionique initiale : transition due à un changement de l_p	171
7.2.2 Par le sel ajouté à posteriori	174
7.2.3 Conformation des chaînes dans les globules	175
7.3 Modulation de la taille finie des globules denses	181
7.3.1 Par la force ionique initiale	181
7.3.2 Par le sel ajouté à posteriori	182
7.3.3 Comparaison avec les tailles obtenues dans le chapitre 5	185
7.4 Résumé	186
8 L'effet de dénaturation	189
8.1 Dénaturation par le PSS	189
8.1.1 Vérification par spectroscopie infra rouge	190

8.1.2	Une dénaturation universelle	191
8.1.3	Recherche d'une origine chimique	192
8.2	Structures obtenues à l'équilibre	195
8.2.1	Structures pour un fort excès de PSS	195
8.2.2	Peut-il y avoir plusieurs structures pour la protéine dénaturée? . . .	197
8.3	Rôle de la compacité de la structure initiale	200
8.3.1	Effet de taille de chaînes de PSS	200
8.3.2	Dénaturation sur des globules denses préformés	201
8.3.3	Structure à $t = 0$ et évolution cinétique	202
8.4	Influence de la densité de charge des objets sur dénaturation	205
8.4.1	Variation de la densité de charge sans ajout hydrophobe	205
8.4.2	Variation de la densité de charge avec ajout d'hydrophobe	208
8.5	Résumé	210
8.5.1	Conditions de dénaturation	210
8.5.2	Proposition d'un mécanisme de dénaturation	211
9	Conclusion	213
9.1	Résultats principaux	213
9.2	Perspectives	217
	Bibliographie	218

Chapitre 1

Introduction

Les systèmes impliquant des interactions entre polyélectrolytes et sphères de charges opposées sont rencontrés dans de multiples domaines et champs d'applications. Les polyélectrolytes permettent par exemple de stabiliser des particules minérales en solution ou encore de les encapsuler pour les délivrer ultérieurement. Ces capacités d'encapsulation sont également utiles en agro-alimentaire où les particules chargées sont cette fois des macromolécules biologiques, essentiellement des protéines. Des polyélectrolytes greffés sur des surfaces peuvent également servir à emprisonner des particules sur ces surfaces. De plus ces systèmes sont également retrouvés dans la nature (par exemple interactions ADN-histones dans l'animal, polysaccharides-protéines dans le végétal), ce qui leur donne également un intérêt en biologie.

Ces larges champs d'application et les nombreux cas où ces systèmes sont présents ont motivé une importante recherche depuis plus de cinquante ans. Une connaissance plus profonde des interactions dans ces systèmes est en effet indispensable afin de maîtriser l'assemblage des composants, pour des applications directes autant que pour mieux comprendre des mécanismes biologiques qui ont une grande complexité.

Les systèmes composés de polyélectrolytes et de particules de charges opposées sont très variés. De cet fait le nombre de systèmes déjà étudiés est très important. Nous avons choisi dans notre étude le cas où les colloïdes chargés sont des protéines -qui sont des particules fort bien définies- ce qui correspond à une grande partie de ces systèmes. Les principales informations qui ressortent des nombreuses études antérieures sont que chacun des systèmes étudiés possède des caractéristiques propres ce qui rend une généralisation des résultats assez difficile. En particulier les polyélectrolytes utilisés pouvant être de charge positive ou négative, amphiphiles, linéaires ou ramifiés, des homopolymères ou des hétéropolymères, libres ou greffés, les paramètres influant sur les interactions avec les protéines sont donc variables d'un cas à l'autre. Les protéines étudiées sont en majorité des protéines globulaires

simples, mais de simples paramètres comme le pI multiplient aussi les possibilités.

Un point qui nous a frappé à la lecture de ces études est que la structure formée par les composants des systèmes à l'échelle locale n'est souvent pas connue ou alors déduite indirectement. Expérimentalement, les structures obtenues sont généralement déduites de mesures macroscopiques (rhéologie) ou de mesures donnant accès à des échelles supérieures à celles des objets (turbidimétrie, diffusion de lumière). A l'opposé, des simulations ont été effectuées pour essayer de déterminer la structure à l'échelle des composants individuels mais elles ne concernent qu'un nombre limité d'objets considérés pour des raisons de temps de calcul et nécessitent d'être vérifiées expérimentalement. C'est pourquoi nous avons choisi de déterminer les structures formées à l'échelle des objets en fonction des paramètres physicochimiques qui peuvent modifier les interactions dans le système (concentration des espèces, longueur des chaînes, force ionique, pH, hydrophobicité des chaînes) à l'aide d'une technique privilégiée : la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

Pour ce faire, nous avons besoin d'un système expérimental modèle. Notre choix s'est porté sur un système composé de polystyrène sulfonate (PSS) et de lysozyme, ce pour deux raisons majeures : les deux composants devaient être très connus individuellement et leurs paramètres d'hydrophobicité et de charges portées devaient être décorrélés.

Le lysozyme est une protéine globulaire, stable en solution et qui ne forme pas d'oligomères, permettant ainsi d'avoir des objets individuels. De plus son pH isoélectrique est très élevé (pH 11) ce qui permet d'obtenir une large gamme de charges positives portées par la protéine pour une gamme de pH raisonnable (de 3 à 10 typiquement pour notre étude). Elle est également peu hydrophobe et donc peu tensioactive. Enfin elle est disponible en grande quantité commercialement et avec une pureté suffisante.

Le PSS est un polyélectrolyte obtenu après sulfonation de polystyrène. Cette sulfonation est faisable en routine et permet de fixer le taux de charge des chaînes à notre choix. La base polystyrène permet une large variété de longueurs de chaînes puisque ce polymère est disponible commercialement dans une grande variété de degrés de polymérisation monomoléculaires. De plus le polystyrène est un polymère très facilement deutériable, propriété très importante en diffusion de neutrons pour effectuer un marquage isotopique.

Lors des expériences de DNPA, la variation de contraste effectuée sur le mélange de ces deux composés (lysozyme et PSS deutérié) permet une détermination précise de la distribution de chacun d'eux de manière indépendante. Il est donc possible d'accéder à la structure du mélange en comparant la distribution des deux espèces au sein d'un même échantillon. Nous verrons que le système que nous avons choisi peut atteindre trois structures différentes

en fonction de différents paramètres. Ces trois structures dont les différences sont bien mises en relief par la diffusion de neutrons correspondent à trois aspects macroscopiques différents observés lors de la réalisation de diagrammes d'état. Nous montrerons la présence de deux frontières déterminant la configuration adoptée par le système.

Une première frontière sera définie entre des échantillons turbides ou limpides. Nous montrerons que les échantillons turbides sont des d'assemblages supramoléculaires des composants du système. A l'inverse nous montrerons que les échantillons limpides sont une coexistence de chaînes en solutions suite à une altération de la structure secondaire de la protéine par le PSS. Nous détaillerons les conditions d'obtention de l'un ou l'autre cas.

Une deuxième frontière sera définie au sein des échantillons turbides. Nous montrerons que deux structures sont accessibles : un réseau gelé et des complexes denses. Nous montrerons que le gel est constitué d'un réseau polyélectrolyte réticulé par les protéines et les complexes des globules denses contenant protéine et polyélectrolyte et organisés à plus grande échelle. Ces globules seront étudiés plus en détail et leurs courbes de diffusion seront ajustées par des modèles simples. Nous montrerons que l'utilisation du marquage isotopique permet d'obtenir des informations inédites et quantitatives sur la taille des objets formés ainsi que leur composition interne en chacun des composés.

Finalement le fait que les différentes structures soient bien définies et que les paramètres expérimentaux puissent être facilement et amplement variés va permettre de montrer que les différentes structures observées sont gouvernées par des interactions électrostatiques bien définies mais différentes pour chacun des cas.

Chapitre 2

Les polyélectrolytes, les protéines et les assemblages formés

Dans ce premier chapitre nous allons tout d'abord présenter le système étudié et nous verrons les différentes propriétés de ses composants. Nous aborderons tout d'abord les objets individuels en introduisant le polyélectrolyte puis la protéine. Dans un second temps nous ferons un tour d'horizon des connaissances sur les complexes polyélectrolyte-protéine, notamment au niveau des interactions qui entrent en jeu ainsi que des structures formées. Nous donnerons finalement des exemples d'utilisation de tels systèmes.

2.1 Les polyélectrolytes

On définit un polyélectrolyte comme un polymère possédant des groupes dissociables en solvant polaire. Il possède ainsi des charges sur ses monomères compensées par des contre-ions de charge opposée. Ces charges permettent au polyélectrolytes en solution d'être utilisés dans de nombreux domaines grâce à leurs propriétés. On citera pour exemple leur propriété à former des gels dans l'eau qui est utilisée pour la fabrication de mousses alimentaires ou encore des gels coiffants. La présence de charges leur permet également d'interagir avec des objets de charges opposées comme nous le verrons plus en détails en 2.3 ce qui leur permet d'être utilisés en agro-alimentaire, en cosmétologie ou encore en médecine.

Il existe de nombreuses interactions dans le système du fait que ces polymères sont chargés. En effet en plus des interactions classiques de polymère à courte portée telles les interactions de volume exclu ou de Van der Waals s'ajoutent des interactions à plus longue portée, les interactions électrostatiques. Celles-ci peuvent en outre être partiellement écrantées par la présence d'ions en solution ou par les chaînes elles-mêmes lorsqu'elles sont en concentra-

tion assez élevée. Leur physique est donc assez complexe et plusieurs paramètres pertinents peuvent être soulevés.

2.1.1 Conformation des chaînes

Deux cas principaux peuvent être distingués : des chaînes faiblement ou fortement chargées. En effet on peut définir pour un polyélectrolyte un paramètre f appelé taux de charge qui correspond au pourcentage de monomères chargés. Ainsi la conformation des chaînes de polyélectrolyte sera directement dépendante de ce paramètre. Il est à pondérer par la condensation des contre-ions. Ce mécanisme a été proposé par Manning¹ et concerne une chaîne portant une fraction f de charges distantes de A , a étant la distance inter-monomères. Il fait intervenir la longueur de Bjerrum, longueur au dessus de laquelle l'interaction électrostatique entre deux charges est supérieure à l'énergie thermique kT :

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon kT} \quad (2.1)$$

avec e une charge élémentaire, ϵ la permittivité du milieu, k la constante de Boltzmann et T la température.

Et on définit le seuil de condensation de Manning par :

$$f_{Manning} = \frac{a}{l_B} \quad (2.2)$$

En pratique, il a été montré que les propriétés de structure dépendent de f en dessous du seuil de Manning mais plus au delà^{2,3}.

2.1.1.1 Effet du taux de charge

Nous considérons ici des chaînes avec un taux de charge inférieur à $f_{Manning}$ comme ayant un faible taux de charge. Dans ce cas, la chaîne n'est pas étirée à toutes les échelles, et il est possible de définir la taille d'un blob électrostatique ξ_e (Khokhlov⁴, Dobrynin⁵) au delà duquel les monomères ne sont plus affectés par les répulsions électrostatiques. La limite de ce

-
- [1] Manning, G. *J. Chem. Soc.* **1949**, 73, 924 et 934.
 - [2] Nishida, K.; Kaji, K.; Kanaya, T. *Macromolecules* **1995**, 28, 2472-2475.
 - [3] Essafi, W.; Lafuma, F.; Williams, C. *European Physical Journal B* **1999**, 9, 261-266.
 - [4] Khokhlov, A. *J. PHYS. A* **1980**, 13, 979-987.
 - [5] Dobrynin, A.; Colby, R. H.; Rubinstein, M. *macromolecules* **1995**, 28, 1859-1871.

blob est atteinte lorsque l'énergie électrostatique est égale à l'énergie thermique. On obtient :

$$\xi_e = (gf)^2 l_B \quad (2.3)$$

Avec g le nombre de monomères par blob.

A l'intérieur du blob électrostatique, la chaîne sera sensible aux effets de volume exclu au delà de la taille du blob thermique ξ_T .

Si $\xi_T > \xi_e$ alors la chaîne sera gaussienne jusqu'à ξ_e (Pfeuty⁶ De Gennes et al.⁷) et

$$\xi_e^2 = ga^2 \quad (2.4)$$

et donc

$$\xi_e = a(l_B/a)^{-1/3} f^{-2/3} \quad (2.5)$$

Aux échelles supérieures la chaîne est un alignement de blobs électrostatiques.

Si $\xi_T < \xi_e$ la chaîne sera tout d'abord gaussienne puis gonflée et enfin étirée.

Ces cas sont valables pour un bon solvant ce qui sera notre cas tout au long de l'étude, nous n'aborderons donc pas ici le cas d'un mauvais solvant. Néanmoins il est nécessaire de se pencher sur le cas particulier du PSSNa qui a été utilisé et dont la forme partiellement chargée contient des monomères hydrophobes.

2.1.1.2 Ecrantage des interactions électrostatiques

Les ions libres en solution créent un écrantage électrostatique. Ainsi si les contre-ions sont situés près des chaînes ou si du sel est ajouté dans la solution, la chaîne perd son caractère rigide à grande échelle. La longueur d'écran κ^{-1} correspondant à l'échelle sensible à l'écrantage électrostatique et appelée longueur de Debye-Hückel est définie comme suit :

$$\kappa_{DH}^{-1} = (4\pi l_B I)^{-1/2} \quad (2.6)$$

Avec I la force ionique de la solution. La force ionique se définit comme la demi somme des concentrations en ions présents en solution multipliées par leur charge au carré :

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (2.7)$$

[6] Pfeuty, P. *Journal De Physique* **1978**, 39, 149.

[7] deGennes, P.; Pincus, P.; Velasco, R. M.; Brochard, F. *J. Phys.* **1976**, 51, 503.

Un ajout de sel dans la solution peut donc changer de façon drastique cette longueur et ainsi induire la perte de rigidité de la chaîne qui pourra prendre une configuration de polymère neutre à grande échelle. Elle restera rigide à une échelle inférieure à la longueur de persistance, notion qui sera abordée plus tard dans le chapitre.

2.1.1.3 Interactions interchaînes

Après le taux de charge et la salinité, un troisième paramètre influant sur la conformation des chaînes est la concentration c en chaînes elles-même. Les chaînes étant chargées, une augmentation de leur concentration induit des interactions électrostatiques entre chaînes voire stériques lorsqu'il y a interpénétration des chaînes en régime semi-dilué.

Lorsque la concentration est inférieure à la concentration limite du régime semi-dilué (c^*), l'influence électrostatique est déjà présente du fait de sa longue portée. De Gennes et al.⁷ ont donné un modèle pour ce cas. Il dit que lorsque les interactions électrostatiques sont supérieures à l'énergie thermique alors le système devrait cristalliser :

$$N^2 f^2 l_B kT / D > kT \quad (2.8)$$

Avec D la distance entre deux chaînes. Dans ce cas chaque chaîne est centrée sur un noeud du réseau.

Dans le cas où la concentration en chaînes est supérieure à c^* on peut envisager que cet ordre soit maintenu ou que les chaînes s'interpénètrent. Pfeuty⁶ a donné une description en loi d'échelles pour ce régime : partant d'une chaîne de blobs électrostatiques, les interactions électrostatiques sont écrantées sur une distance ξ . Cette distance varie avec la concentration tel que :

$$\xi \propto c^{-1/2} \quad (2.9)$$

Au delà de cette distance, les chaînes peuvent se courber et aboutir à une configuration gaussienne. Cette distance ξ est facilement mesurable en diffusion de lumière, neutrons ou rayons X. Sa mesure en diffusion de neutrons sera présentée dans le chapitre de diffusion de neutrons.

2.1.2 La longueur de persistance

la longueur de persistance peut être définie comme nous l'avons vu par des effets de longueur d'écran ou par le paramètre ξ en régime semi-dilué. Cependant dans le cas du régime semi-dilué il existe plusieurs théories sur cette longueur de persistance. Nous n'entrerons pas

ici dans le détail de toutes ces théories mais néanmoins voici un résumé de quelques unes d'elles.

La première est proposée par Odijk⁸, Skolnick et Fixman⁹. Elle considère une longueur de persistance L_T qui est la somme d'une longueur de persistance due à la flexibilité de la chaîne et d'une longueur de persistance due aux interactions électrostatiques.

$$L_T = l_0 + l_e \quad (2.10)$$

et

$$l_e = \frac{l_B}{4\kappa^2 A^2} \quad (2.11)$$

La longueur étirée de la chaîne L doit être inférieure à $L_T/2$ et κL grand, ainsi on aboutit en tenant compte de la condensation de Manning ($A = l_B$) à :

$$L_T = l_0 + \frac{1}{4\kappa^2 l_B} \quad (2.12)$$

Ce modèle impose cependant que l_e soit très petit devant l_0 et donne l_e proportionnel à κ^{-2}/l_B au lieu de κ^{-1} pour les lois d'échelle.

Un second modèle est proposé par Barrat et Joanny¹⁰ pour les chaînes flexibles, soit des chaînes où $l_e > l_0$, qui limite le modèle d'Odijk à :

$$A \ll \sqrt{(l_0 l_B)} \quad (2.13)$$

Hors de cette limite, les auteurs ont montré que la longueur de persistance est directement dépendante de la longueur d'écran. En effet en se basant à nouveau sur un modèle de blobs électrostatiques à l'intérieur desquels la chaîne est sans interactions, ils considèrent que chaque blob est soumis à une tension dépendante de l'énergie thermique. Ainsi les changements d'orientation de la chaîne n'auront lieu qu'au delà de la taille du blob et :

$$l_p \propto \kappa^{-1} \quad (2.14)$$

[8] Odijk, T. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **1977**, 15, 477-483.

[9] Skolnick, J. ; Fixman, M. *Macromolecules* **1977**, 10, 944-948.

[10] Barrat, J.-L. ; Joanny, J.-F. *Europhysics Letters* **1993**, 24, 333.

2.1.3 Le polystyrènesulfonate

Le polyélectrolyte choisi pour notre étude est le polystyrènesulfonate (PSS). Il s'agit d'un polyélectrolyte chargé négativement en solution et possédant un squelette hydrophobe (voir figure 2.1).

2.1.3.1 Caractéristiques du PSS

Le choix du PSS a été motivé par plusieurs raisons. Tout d'abord il s'agit d'un polyélectrolyte avec une fonction acide forte, ainsi son sel correspondant lorsqu'il est dissous en solution est totalement chargé et ce peu importe le pH utilisé. Il s'agit là d'un avantage majeur par rapport par exemple aux polysaccharides pour lesquels on doit tenir en compte le pK_a pour connaître la charge à un pH donné. Deuxièmement il s'agit d'un polyélectrolyte qui peut être rendu partiellement hydrophobe. En effet le principe même de sa préparation (voir 2.1.3.2) fait qu'il est possible d'avoir des unités de répétition styrène (soit sans fonction sulfonate greffée) dans des proportions comprises entre 0 et 70 % (au delà il n'est plus soluble en solvant aqueux). Ainsi le polyélectrolyte est partiellement chargé et les unités de répétitions non chargées sont elles hydrophobes.

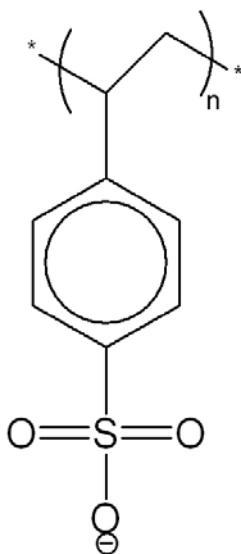


FIG. 2.1 – Représentation schématique d'une unité de répétition PSS

Enfin le dernier paramètre qui a motivé le choix du PSS est la possibilité de l'obtenir deutérié. En effet les mesures de DNPA pour être plus intéressantes nécessitent un marquage isotopique comme nous le verrons en 3.3. Ce marquage s'effectue en substituant les atomes d'hydrogène (H_1^1) par des atomes de deutérium (H_1^2). Le polyélectrolyte choisi se devait donc d'être facilement deutériable afin de permettre de telles mesures. Or la préparation du PSS

se faisant directement par une réaction sur du polystyrène déjà polymérisé, il est très facile d'obtenir du polystyrène deutérié pour des coûts raisonnables.

Les caractéristiques en solution du PSS sont bien connues puisqu'il a fait l'objet de nombreux travaux.

2.1.3.2 Synthèse du PSS

La sulfonation du polystyrène a été effectuée suivant la méthode décrite par Damien Baigl et al.^[11] et dérivée de la méthode de Makowski^[12]. Cette synthèse du poly(styrène-co-styrènesulfonate de sodium) s'effectue en plusieurs étapes et se fait sur des chaînes de polystyrène qui possèdent le nombre de monomères souhaités. De plus contrairement à d'autres techniques telles que la méthode de Vink^[13], elle permet de choisir le taux de greffage voulu et ainsi d'obtenir des PSSNa partiellement sulfonés. Elle consiste à greffer les fonctions sulfonate sur les cycles aromatiques. Un réactif, créé in-situ par la réaction entre l'anhydride acétique et l'acide sulfurique, attaque les cycles aromatiques en ortho et para pour greffer la fonction sulfonate. Néanmoins la gêne stérique due à la chaîne de polymère fait que le greffage de la fonction n'a lieu que sur le site para. Suivant les quantités de réactif introduites par rapport à la quantité de polystyrène, le nombre de monomères styrene subissant le greffage peut être fixé (entre 40 et 100%) et on obtient le poly(styrène-co-acide styrenesulfonique). Le produit obtenu est ensuite neutralisé à la soude pour former le sel de sodium correspondant, le poly(styrène-co-styrènesulfonate de sodium).

Mode opératoire :

1g de polystyrène est introduit dans un ballon de 50 mL avec comme solvant 14 mL de dichloroéthane. Ce ballon est équipé d'une ampoule de coulée isobare et est placé sous un réfrigérant. Pour éviter toute inhibition de la réaction, celle-ci est effectuée sous atmosphère neutre (azote ou argon). Le milieu réactionnel est porté à 323 K et après totale dissolution du polystyrène, l'anhydride acétique est introduit par l'ampoule de coulée. L'acide sulfurique pur est ensuite introduit également par l'ampoule de coulée au goutte à goutte. Les quantités de réactif sont fonction du degré de sulfonation souhaité. Pour avoir environ 50% de sulfonation, la concentration en anhydride acétique doit être égale à celle en polymère. Pour avoir environ 90% de sulfonation elle doit être quatre fois supérieure. De même le rapport entre la concentration en acide sulfurique et celle en anhydride acétique doit être égale à

[11] Baigl, D. ; T.A.P.Seery, ; Williams, C. *Macromolecules* **2001**, 35, 2318-2326.

[12] Makowski, H. ; Lundberg, R. ; Singhal, G. *Exxon Research and Engineering Company* **1975**, U.S. Patent 3 870 841,.

[13] Vink, H. *Makromol. Chem.* **1980**, 182, 279.

1.1. Le milieu réactionnel est laissé à 323 K pendant 4 heures puis la réaction est stoppée en plongeant le ballon dans un bain à 283 K. Le produit obtenu étant insoluble en milieu organique il suffit d'éliminer le surnageant pour récupérer le poly(styrène-co-acide styrene-sulfonique). Ce produit est ensuite dissout dans 100 mL d'eau distillée et est neutralisé par de la soude 2*N* pour obtenir le sel de sodium correspondant. Il est nécessaire de dialyser la solution afin d'éliminer l'excès de sel introduit. La dialyse s'effectue dans des membranes en cellulose avec des tailles de coupure choisies en fonction de la taille des polymères, elle est reconduite jusqu'à ce que les bains de dialyse aient la même conductivité que l'eau distillée. La dernière étape consiste en la lyophilisation du polyelectrolyte pour obtenir le produit final qui se présente sous la forme d'une mousse blanche, la lyophilisation ayant pour effet de légèrement expander le polyélectrolyte.

2.2 Les protéines

Intéressons nous maintenant à la protéine. Nous présenterons ici dans un premier temps les protéines en général puis nous nous focaliserons sur la protéine que nous utiliserons : le lysozyme.

2.2.1 Généralités

Les protéines sont des hétéropolymères naturels synthétisés monomère par monomère sur le ribosome via la séquence ADN qui est le code de ce polymère. Le mécanisme entier consiste en une première lecture de l'ADN situé dans les noyaux des cellules qui va permettre la création des ARN messagers qui vont donner les instructions de montage aux ribosomes qui vont assembler les acides aminés apportés par l'ARN de transfert. Chaque triplet de nucléotides présents sur les gènes de l'ADN (Cytosine, Guanine, Thymine (Uracile en ARN messager) et Adénine) correspond à un acide aminé spécifique qui est donc ajouté au fur et à mesure de la lecture. Un dernier code signifiant un arrêt permet de finir le montage de la protéine. A ce stade, la protéine est un enchaînement d'acides aminés qu'on appelle structure primaire. Ces acides aminés vont ensuite s'organiser pour former la structure secondaire et former des hélices α , des feuillets β ou des coudes. Enfin ces structures secondaires vont finalement s'organiser et former une structure tertiaire. Dans cette dernière organisation, généralement les zones hydrophiles et hydrophobes se séparent, les zones hydrophobes allant au coeur de la protéine ou sur la surface pour des protéines membranaires. De plus, afin de stabiliser un maximum la protéine peuvent apparaître des ponts disulfure entre des cystéines, ces ponts forçant la protéine à conserver sa structure.

Les mécanismes de repliement sont encore mal connus mais néanmoins beaucoup de la recherche actuelle sur les protéines porte sur cet aspect. Il a été montré que la protéine passe par des états intermédiaires pour atteindre son état dit natif, où elle sera fonctionnelle. Dans cet état elle sera thermodynamiquement stable et son énergie libre sera minimale. Néanmoins il y a des barrières d'énergie à franchir pour atteindre cet état et donc une forme dénaturée possédant une énergie libre plus forte est également un état stable de la protéine. Cet état dénaturé (non fonctionnel) peut également être stable et c'est pourquoi parfois les protéines ayant été dénaturées (par chauffage, réaction chimique ou interaction avec une autre molécule) ne retrouvent pas leur état natif.

Certains acides aminés ont la possibilité de porter des charges suivant le pH et donc donnent une charge à la protéine. Les différents acides aminés existants sont représentés sur la figure 2.2¹⁴, ils sont au nombre de 20. La figure représente leur structure chimique et donne leur nom complet ainsi que leur nom codé à trois lettres.

Il existe treize acides aminés neutres, ils ne portent jamais de charge quel que soit le pH (Ala, Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp et Val) et sept peuvent porter une charge. Sur ces sept, quatre sont basiques (Arg $pK_a = 12.5$, Cys $pK_a = 8.2$, Lys $pK_a = 10.5$ et Tyr $pK_a = 10.5$) et trois sont acides (Asp $pK_a = 3.9$, Glu $pK_a = 4.1$, His $pK_a = 6$). Les charges finalement portées par la protéine sont donc fonction de la composition en acides aminés ainsi que du pH. Le pK_a théorique de la protéine est une combinaison des différents pK_a des acides aminés pondérée par leur nombre. De plus les acides aminés terminaux possèdent par définition une possibilité de charge puisqu'un des deux est fini par une fonction acide et l'autre par une fonction amine. En pratique il faut également tenir compte du fait que certains acides aminés ne sont pas accessibles par les molécules d'eau du solvant et donc celui-ci peut être légèrement différent du pK_a théorique.

Les acides aminés peuvent également être classés par ordre d'hydrophobicité. Les plus hydrophobes sont notamment Phe, Met, Ile, Leu, Val et Cys.

2.2.2 Le lysozyme

La protéine que nous avons choisi pour notre étude est le lysozyme 1-LYS de nom complet peptidoglycan N-acetylmuramoylhydrolase. Elle possède 129 acides aminés, sa masse moléculaire est de 14300. Sa structure est schématisée sur la figure 2.3¹⁵.

Cette structure est très stable du fait de la présence de 4 ponts disulfures. Il s'agit de

[14] <http://fr.wikipedia.org>.

[15] <http://www.rscb.org/pdb>.

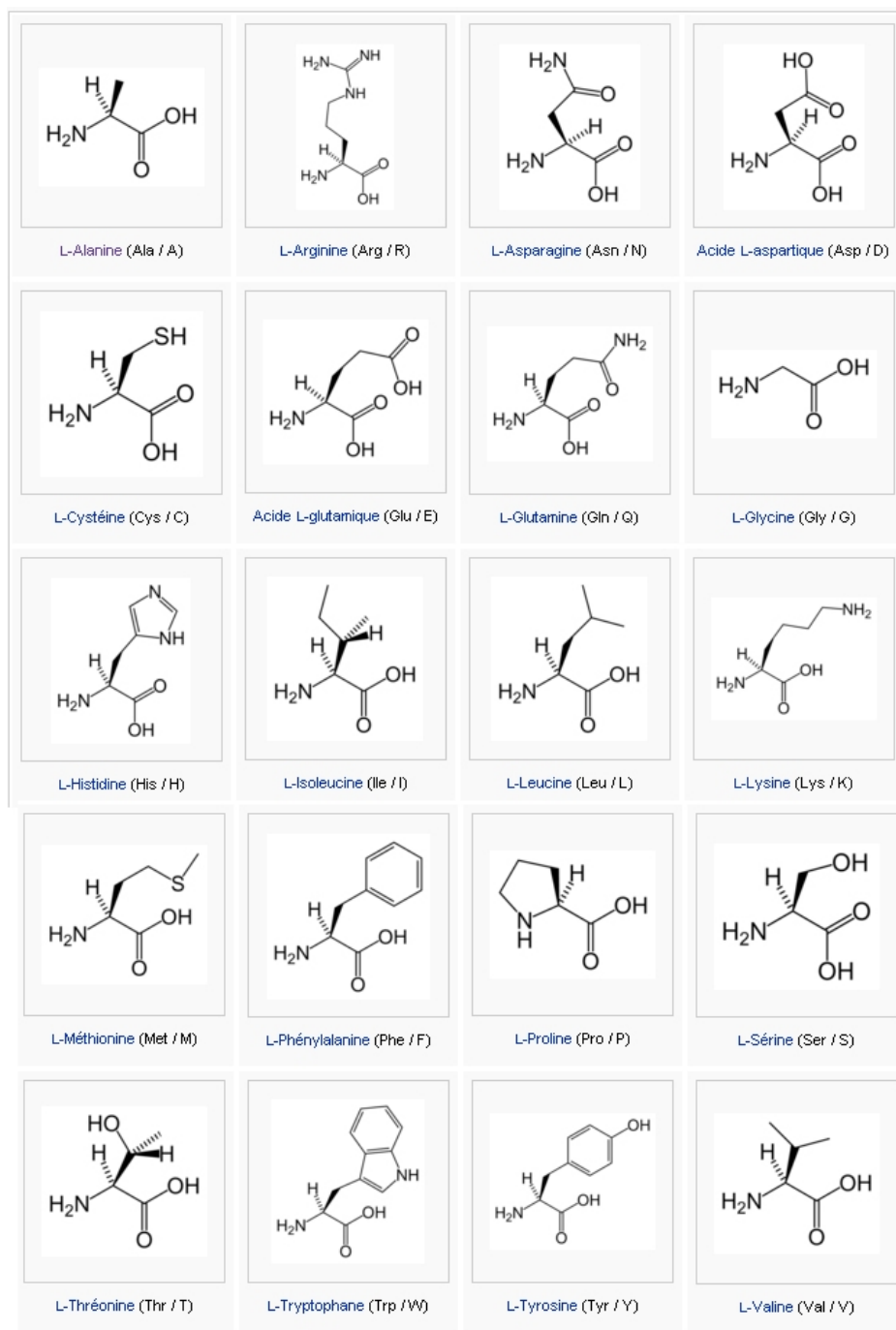


FIG. 2.2 – Les acides aminés et leurs noms codés



FIG. 2.3 – Représentation tridimensionnelle du lysozyme ainsi que de sa structure secondaire

la structure native et naturelle du lysozyme issue du blanc d'oeuf de poule, il est en effet possible de trouver des dizaines de structures légèrement différentes pour les différents mutants de cette protéine. Sa structure ainsi que quelques acides aminés de la séquence peuvent également changer suivant la source d'extraction du lysozyme (homme, poisson, etc...). Nous avons choisi le lysozyme de blanc d'oeuf de poule pour plusieurs raisons :

- c'est une des protéines les plus faciles à extraire.
- elle ne forme pas d'oligomères ni d'agrégats à bas pH¹⁶. C'est donc un objet globulaire colloïdal.
- elle possède des propriétés de charge intéressantes. En effet, sur ses 129 acides aminés, 31 sont susceptibles de porter des charges, aboutissant à un pH isoélectrique de 11. Le lysozyme est donc susceptible de porter un nombre important de charge pour un pH acide.

Afin de déterminer précisément la charge de la protéine en fonction du pH, une courbe de titration a été effectuée (figure 2.4). Le titrage a été effectué par Swiss-Prot.

Cette courbe montre deux inflexions dans la courbe de dosage, ces inflexions correspondant aux pK_a des acides aminés acides (environ 4) et des acides aminés basiques (environ 10). Cette courbe permet de voir que pour une gamme de pH raisonnable (entre 3 et 10) la protéine possède une charge positive nette située entre 5 et 17. Ceci en fait un excellent candidat pour une complexation avec un polyélectrolyte négatif comme le PSSNa.

Le lysozyme utilisé dans notre étude est un lysozyme commercial (Sigma-Aldrich) a été utilisé tel quel. Sa pureté a été vérifiée par Olga Vidal¹⁷, au cours de sa thèse.

[16] Sophianopoulos, A.; VanHolde, K. *J. Bio. Chem.* **1964**, 239, 2516.

[17] Vidal, O. *Thèse de doctorat Université Paris VI* **1996**, .

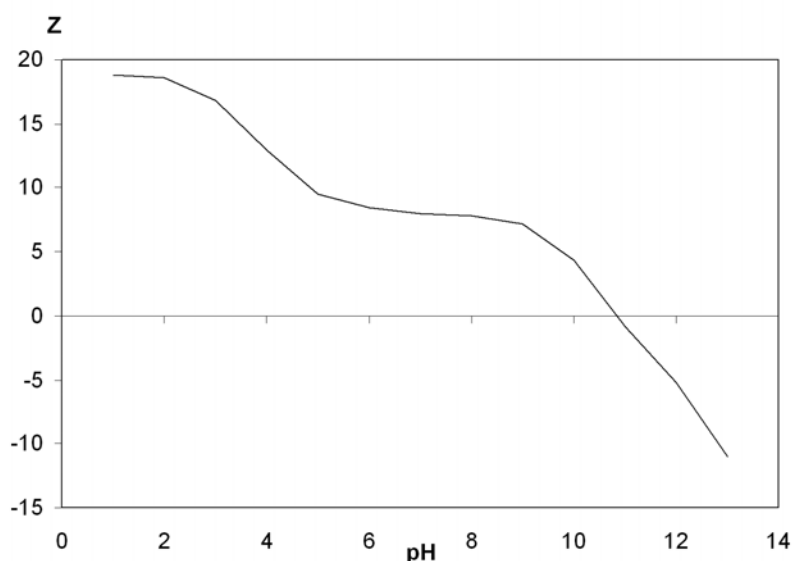


FIG. 2.4 – Charge nette du lysozyme en fonction du pH

2.3 Les complexes

Après avoir présenté les composants de notre système et leurs principales caractéristiques, penchons nous à présent sur les interactions en solutions entre ceux-ci. La littérature est assez fournie sur le sujet et plusieurs revues ont été publiées ces dernières années^{18,19,20,21,22} nous tâcherons ici d'en résumer les principales informations, notamment au niveau de la nature des interactions dans ces systèmes ainsi qu'au niveau des structures observées jusqu'à présent.

Les premières études sur le sujets datent d'il y a plus de 50 ans. Elles avaient été menées par Morawetz et Hugues²³ dans le but de séparer et purifier des protéines. Les chaînes de polyélectrolytes pouvant facilement interagir avec une protéine de charge opposée, ils s'en servirent de séparateur. Le même Morawetz a ensuite étudié cette complexation afin de stabiliser des protéines en milieu potentiellement dénaturant pour des activités enzymatiques²⁴. En effet les protéines incluses dans ces complexes conservent généralement leur état natif

[18] Xia, J.; Dubin, P. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag **1994**, .

[19] Tolstoguzov, V. *Food science technologies* **1997**, *80*, 171-198.

[20] Doublier, J.; Garnier, C.; Renard, D.; Sanchez, C. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2000**, *5*, 202-214.

[21] Tribet, C. *Surfactant science series* **2001**, .

[22] Cooper, C.; Dubin, P.; Kayitmazer, A.; Turksen, S. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2005**, *10*, 52-78.

[23] Morawetz, H.; Hugues, W. *J. Phys. Chem.* **1952**, *56*, 64-69.

[24] Morawetz, H.; Sage, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1955**, *56*, 103-109.

comme le montre plusieurs études menées sur des protéines enzymatiques^{25,26}. Cette propriété a donc permis d'étendre le champs des applications à l'agro-alimentaire ou encore à la pharmacologie où la protection et l'encapsulation des protéines nécessite qu'elles conservent leur aspect fonctionnel. Le domaine médical et biologique est également très intéressé par ces système de part l'étude de l'ADN et des histones qui sont un système s'approchant des études entre polyélectrolytes et protéines "classiques"^{27,28,29}. De nos jours, l'interêt porté à ces études est accru du fait des nouvelles applications qu'on peut lui trouver comme par exemple les biopuces. En effet la possibilité de faire des multicouches de polyélectrolyte et d'y inclure ensuite des protéines est très prometteur³⁰. Cette application a permis de redonner un élan à l'étude des systèmes polyélectrolyte-protéine avec comme but d'obtenir des biopuces permettant par exemple de détecter des anticorps.

Finalement les domaines désormais porteurs pour ces systèmes sont principalement l'agro-alimentaire et la pharmacologie pour l'encapsulation et le relargage de protéines ainsi que les biopuces réagissant aux stimuli par effet de la protéine greffée.

Nous nous pencherons tout d'abord sur les interactions présentes dans ces systèmes, puis nous détaillerons les structures observées jusqu'à présent et enfin nous reviendrons sur les applications de ces systèmes.

2.3.1 Les forces mises en jeu lors de la complexation

Plusieurs forces non covalentes peuvent entrer en jeu dans la formation des complexes entre protéines et polymères, suivant le type de polymères considérés. Ces forces sont principalement les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques et les interactions hydrophobes. Nous allons ici revenir sur ces différents cas pour avoir une vue d'ensemble de ces interactions.

2.3.1.1 Liaisons hydrogène

Tout d'abord des complexes peuvent se former avec des polymères hydrophiles neutres mais capables de former des liaisons hydrogène via des doublets libres sur des azotes ou des

[25] Parker, D.; Glatz, C.; Ford, C.; Gendel, S.; Suominen, I.; Rougvie, M. *Biotech. Bioeng.* **1990**, *36*, 467-475.

[26] Margolin, A.; Shertyuk, S.; Izumrudov, V.; Zezin, A.; Kabanov, V.; Belozersky, A. *European Journal of Biopolymers* **1985**, *146*, 625-632.

[27] Kassapidou, K.; Jesse, W.; Kuil, M.; Lapp, A.; Egelhaaf, S.; maarel, J. V. d. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2671-2684.

[28] Raspaud, E.; cruz, M. O. d. l.; Sikorav, J.; Livolant, F. *Biophysical journal* **1998**, *74*, 381-393.

[29] Matsuzawa, Y.; Kanbe, T.; Yoshikawa, K. *Langmuir* **2004**, .

[30] Eremenko, A.; Kurochkin, I.; Chernov, S.; Barmin, A.; Yaroslavov, A.; Moskvitina, T. *Thin solid films* **1995**, *260*, 212-216.

hydrogènes par exemple. Ce genre d'interaction ne pourra cependant avoir lieu qu'en milieu assez acide pour que les fonctions acide carboxylique de la protéine puissent interagir avec ces doublets. Les polymères les plus enclins à ces interactions sont les polymères contenant des fonctions amide, ether ou encore alcool³¹. Les liaisons hydrogènes sont peu rencontrées dans le cas des polyélectrolytes du fait de la prépondérance des forces électrostatiques mais cependant on peut légitimement penser que de telles liaisons peuvent être présentes dès qu'une chaîne possède un squelette PEG ou polysaccharide.

2.3.1.2 Interactions électrostatiques

Dans le cas des polyélectrolytes, il est accepté que les forces d'interactions principales sont les interactions électrostatiques. Et donc il en découle que les paramètres influant la complexation sont souvent des paramètres influant sur ces interactions tels que le pH, la force ionique ou encore le taux de charge du polyélectrolyte. Les études ont montré que l'association de polymères cationiques avec des colloïdes chargés négativement aboutit souvent à des séparations de phase dues à des fortes interactions entre espèces de charges opposées³². Par analogie, il a été observé de nombreux cas où des complexations entre polyélectrolytes cationiques et protéine chargées négativement ont abouti à des séparations de phase³³. Les polyélectrolytes utilisés sont principalement des sels d'ammonium quaternaires qui possèdent donc une charge positive à bas pH, nécessitant une protéine à bas point isoélectrique lui permettant de porter des charges négatives à ces bas pH. Le cas inverse de polyélectrolyte négativement chargé et de protéine positivement chargée a été encore plus étudié du fait du plus grand nombre de polyélectrolytes utilisables. Les fonctions chimiques telles que sulfate, sulfonate, carboxylate ou encore phosphate permettant d'obtenir des charges négatives en solution, les possibilités pour le polyélectrolyte sont d'autant plus grandes. Plusieurs études ont montré (par exemple celles de Tsuboi³⁴ et Kokufuta³⁵) que pour un système à faible force ionique, le nombre de groupement chargés de polyélectrolyte par gramme de protéine est constant à un pH donné et ce quel que soit le squelette du polyélectrolyte et sa longueur. De plus cette complexation est stoechiométrique et mène à des complexes neutres qui précipitent et ne contiennent pas de contre-ions. Des études menées par Xia³⁶ et Park³⁷ ont également montré que des polyélectrolytes négativement chargés peuvent former des complexes solubles

[31] Azegami, S.; Tsuboi, A.; Izumi, T.; Hirata, M.; Dubin, P.; Wang, B.; Kokufuta, E. *Langmuir* **1999**, *15*, 940-947.

[32] Matsudo, T.; Ogawa, K.; Kokufuta, E. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1794-1799.

[33] Gao, J. Y.; Dubin, P. L.; Muhoherac, B. B. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5529-5535.

[34] Tsuboi, A.; Izumi, T.; Hirata, M.; Xia, J.; Dubin, P. L.; Kokufuta, E. *Langmuir* **1996**, *12*, 6295-6303.

[35] Kokufuta, E. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag **1994**, 301-325.

[36] Xia, J.; Dubin, P. L.; Kim, Y.; Muhoherac, B. B.; Klimkowski, V. J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 4528-4534.

[37] Park, J.; Muhoherac, B.; Dubin, P.; Xia, J. *Macromolecules* **1992**, *25*, 290-295.

avec des protéines négativement chargées près de leur point isoélectrique. Ceci s'explique par la présence à la surface de la protéine de patches de charges positives (la charge globale restant négative) permettant aux polyélectrolytes d'interagir avec la protéine via un point d'ancrage qui localement est plus fort que les forces de répulsion dues à la charge nette négative de la protéine. Il est cependant nécessaire d'atteindre un pH critique (qui peut se situer sous le point isoélectrique) pour observer une complexation³⁸.

2.3.1.3 Interactions hydrophobes

Nous venons de voir que les interactions électrostatiques sont le moteur principal des complexations entre protéines et polyélectrolytes. Il existe cependant plusieurs points indiquant que les interactions hydrophobes ont également un rôle à jouer. Un de ces points est le fait que des enthalpies d'association qui ont été mesurées par calorimétrie sur des complexes polyélectrolyt-protéine ont parfois montré une dépendance de la température ce qui est caractéristique d'interactions hydrophobes. D'autres moyens de déterminer l'hydrophobicité est de faire des mesures par chromatographie³⁹ ce qui permet de déterminer cette fois l'hydrophobicité de surface qui est celle qui va intervenir dans les interactions avec les polyélectrolytes. En effet souvent l'hydrophobicité est directement estimée depuis la structure primaire de la protéine et donc ne tient pas compte du repliement de la protéine qui a souvent tendance à mettre les zones hydrophobes au coeur de celle-ci.

Sato et al.⁴⁰ ont montré par fluorescence que l'association de polyélectrolytes possédant des groupements hydrophobes avec une protéine proche de son point isoélectrique est due à des interactions hydrophobes. En effet ils ont vu, pour le lysozyme dont le pI est à 10.5, que des complexes sont formés entre $pH = 10.3$ et $pH = 12$ et que la turbidité résultante de ces complexes est indépendante des interactions électrostatiques.

2.3.2 Les structures observées

Le mélange de polyélectrolyte et de protéines en solution peut généralement aboutir à plusieurs cas :

- une séparation de phase entre deux phases riches contenant chacune un des composés (généralement si ils ont même charge)
- une association engendrant la création d'un complexe soluble ou d'un gel.
- une séparation de phase entre les objets et le solvant aboutissant à la formation de

[38] Kaibara, K.; Okazaki, T.; Bohidar, H.; Dubin, P. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 100-107.

[39] Perkins, T.; Mak, D.; Root, T.; Lightfoot, E. *J. Chrom.* **1997**, *766*, 1-14.

[40] Sato, T.; Mattison, K. W.; Dubin, P. L.; Kamachi, M.; Morishima, Y. *Langmuir* **1998**, *14*, 5430-5437.

coacervats ou de précipités.

La détermination de ces structures polyélectrolyte-protéine a été jusqu'ici effectuée principalement par diffusion de lumière et par rhéologie. Ces techniques ont permis de proposer différents paramètres régissant le système. Nous allons ici donner quelques exemples de résultats observés dans la littérature.

2.3.2.1 Complexes denses

Lorsque la structure forme des objets denses, la diffusion de lumière est une technique qui permet d'obtenir leur rayon moyen et leur masse. Peu d'études ont été menées dans ce sens mais néanmoins des résultats intéressants ont été proposés. Une étude par diffusion de lumière nécessite une concentration peu élevée en polymère (moins de 10 % en masse) et une forte force ionique. Tsuboi et al.³⁴ ont notamment déterminé des tailles de complexe PVS-protéines entre 37 et 79 Å et montré que ces complexes sont composés au maximum de deux chaînes de polymère. D'autres mesures effectuées par Azegami et al.³¹ ont montré la formation de complexes de type collier de perles où les chaînes de polyélectrolyte complexes plusieurs protéines, ce qui est également le cas dans l'étude de Tsuboi et al.. Dans leurs cas, les calculs montrent que dans les complexes il n'y a pas stoechiométrie de charge venant des deux espèces du fait des différences de densité de charge entre elles. Ceci expliquerait le fait d'obtenir de petites tailles d'agrégats.

D'autres études menées par Tribet et al.⁴¹ ont montré que l'utilisation de polyélectrolytes courts mène à la formation de complexes formés d'une protéine entourée de plusieurs polymères, aboutissant à des rayons proches de celui de la protéine seule.

Ball et al.⁴² ont eux montré sur un système composé de BSA et de PAH via des mesures de turbidimétrie que l'agrégation entre ces deux objets augmente jusqu'à atteindre un maximum en fonction du rapport des concentrations introduites pour former des objets de taille micrométrique puis leur taille diminue lorsque ce rapport augmente encore. De plus il a été montré par zétamétrie qu'au maximum d'agrégation les complexes sont neutres alors qu'aucune précipitation des complexes n'est observée.

Ces mesures aboutissent néanmoins à des rayons effectifs et la composition exacte des objets mesurés reste assez floue.

[41] Tribet, C.; Porcar, I.; Bonnefont, P. A.; Audebert, R. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, 102, 1327-1333.

[42] Ball, V.; Winterhalter, M.; Schwinté, P.; Lavalle, P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2357-2364.

2.3.2.2 Gels

La structure gel est retrouvée très largement dans les cas de solutions de protéines seules. L'obtention de ces structures est souvent couplée à une dénaturation de la protéine⁴³. Mais cette structure a également été observée pour des complexes polyélectrolyte-protéine et surtout été caractérisée par le biais de mesures rhéologiques. Par exemple Borrega et al.⁴⁴ ont montré que l'association de polyélectrolyte partiellement hydrophobes conduisent à la formation d'un réseau, structure déduite du fait que le module visco-élastique de la solution est dramatiquement augmenté. La transition sol-gel a lieu lorsque le rapport polymère/protéine est proche de 2. Dans ce cas précis, ce sont les interactions entre les parties hydrophobes du polyélectrolyte et la protéine qui sont à l'origine de la formation du gel. La formation des gels semble être un phénomène non réversible, en effet une fois formé, celui-ci ne peut qu'évoluer vers des complexes solubles ou précipiter.

2.3.2.3 Coacervation et précipitation

Les structures formées peuvent également aboutir à une démixion qui peut être de deux types :

- les complexes se séparent de leur solvant et forment une phase solide, le précipitat. Il y a donc une séparation solide-liquide.
- les complexes restent solubles mais deux phases liquides non miscibles se séparent, formant alors deux phases, une riche en complexes et l'autre pauvre. La structure finale est donc des complexes toujours solubles concentrés dans une phase riche, le coacervat.

La précipitation est souvent observée lorsque la densité de charge sur chacun des composants du système est élevée et que la force ionique est faible, permettant ainsi aux interactions électrostatiques d'être maximales. Ces différents cas sont présentés dans une revue de Dubin et al.⁴⁵. Le rôle des interactions électrostatiques lors de la précipitation est d'autant plus clair qu'un ajout de sel, et donc un écrantage de ces interactions, permet de réduire la précipitation⁴⁶.

La coacervation de complexes polyélectrolyte-protéine est également rencontré dans de nombreux cas et a fait l'objet de revues, notamment celle de De Kruif et al.⁴⁷. Un mécanisme de coacervation a été proposé par Kaibara et al.³⁸ consistant à la formation de gouttelettes

[43] Le Bon, C.; Nicolai, T.; Durand, D. *Macromolecules* **1999**, 32, 6120-6127.

[44] Borrega, R.; Tribet, C.; Audebert, R. *Macromolecules* **1999**, 32, 7798-7806.

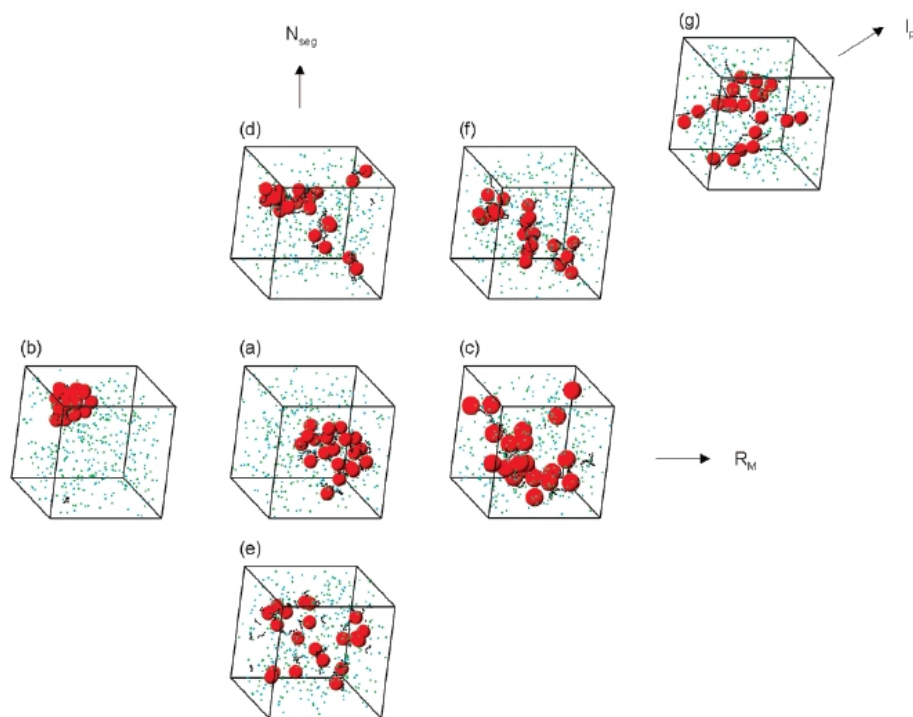
[45] Dubin, P. L.; Gao, J.; Mattison, K. *Separation and Purification Methods* **1994**, 23, 1-16.

[46] Trinh, C. K.; Schnabel, W. *Angewandte Makromolekulare Chemie* **1993**, 212, 167-179.

[47] Kruif, C. G. d.; Weinbrecka, F.; Vriesc, R. d. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2004**, 9, 340-349.

composées du complexe qui reste soluble mais en forte concentration, ces gouttelettes formant ensuite la phase riche. Il est également possible que ces gouttelettes restent stables en suspension.

2.3.2.4 Les structures obtenues par simulation



Typical configurations for different solutions of macroions and oppositely charged polyelectrolytes at the stoichiometric charge ratio $\beta = 1$. The systems are (a) the reference system (Table 1) and the reference system but (b) $R_M = 10$ Å, (c) $R_M = 20$ Å, (d) $N_{pe} = 5$ and $N_{seg} = 40$, (e) $N_{pe} = 40$ and $N_{seg} = 5$, (f) $l_p = 42$ Å, and (g) $l_p = 1480$ Å. Color coding as in Figure 2.

FIG. 2.5 – Résultats des simulations de Skepö et al.

Des simulations sur les systèmes polyélectrolyte-protéine ont été effectuées depuis une dizaine d'années. Cependant elles ne considèrent souvent qu'une chaîne et une protéine^{48,49,50,51}; des travaux considérant plusieurs sphères chargées et plusieurs polyélectrolytes ont cependant été effectués par le groupe de Linse^{52,53}. Ils ont également effectué des études où les sphères sont des protéines⁵⁴, tenant ainsi compte des inhomogénéités de charge de surface. Le facteur principal étudié est la rigidité des chaînes avec donc des longueurs de persistance

[48] Chodanowski, P.; Stoll, S. *Macromolecules* **2001**, *34*, 2320-2328.

[49] Stoll, S.; Chodanowski, P. *macromolecules* **2002**, *35*, 9556-9562.

[50] Ulrich, S.; Laguerre, A.; Stoll, S. *Macromolecules* **2005**, *38*, 8939-8949.

[51] Netz, R. R.; Joanny, J. F. *Macromolecules* **1999**, *32*, 9013-9025.

[52] Jonsson, M.; Linse, P. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 10975-10985.

[53] Skepo, M.; Linse, P. *Macromolecules* **2003**, *36*, 508-519.

[54] Carlsson, F.; Malmsten, M.; Linse, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3140-3149.

variables. La limitation principale de ce genre d'études est le nombre limité de sphères et de chaînes qu'il est possible de prendre en compte du fait des capacités de calcul. Néanmoins des structures caractéristiques ont été déterminées. Il a notamment été montré que lorsque le nombre de charges apportées par la particule est proche du nombre de celles apportées par le polyélectrolyte, il intervient une séparation de phase tant que la fraction volumique totale en objets reste suffisant importante. Par contre pour un excès de charges de l'un ou l'autre des composés, les structures formées restent solubles. Ces simulations ont également montré la formation de structures denses lorsque la particule est petite (10\AA) alors que des structures plus lâches sont formées lorsque celle-ci est plus grande (20\AA). La formation des objets denses est accompagnée d'un relarguage des contre-ions. Lorsque la taille des chaînes est faible, de petits agrégats sont formés. Leur taille augmente ensuite avec la longueur des chaînes avant de reformer des agrégats plus petits. Enfin une augmentation de la longueur de persistance des chaînes aboutit à la formation d'assemblages linéaires puisque les chaînes ne peuvent plus s'enrouler autour des particules.

Ces différents résultats seront détaillés ultérieurement dans le manuscrit et comparés avec les structures que nous auront déterminé de manière expérimentale.

C_i [M] k_{ang} [$k_B T / \text{deg}^2$]	0	0.01	0.1	0.3	1
0					
0.0005					
0.001					
0.005					
0.01					
0.02					

Fig. 1. MC Equilibrated conformations of semiflexible polyelectrolyte-particle complexes as a function of salt concentration and chain flexibility

FIG. 2.6 – Résultats des simulations de Stoll et al. sur l'effet de force ionique et de rigidité de chaîne

Les simulations effectuées par Stoll et al.^{48,49,50} l'ont été par méthode Monte Carlo et

concernent également les interactions entre des chaînes de polyélectrolyte et des particules sphériques de charge opposée. Les simulations concernent cette fois une seule particule et une seule chaîne. Les études ont principalement consisté à déterminer l'effet de rigidité de chaîne sur la complexation, de la longueur des chaînes, des effets de force ionique et de taille de particule. Dans le cas de polyélectrolytes forts⁴⁹, il a été montré que la rigidité des chaînes influe sur la proportion de monomères adsorbés sur la surface de la particule ainsi que leur distribution. En particulier la figure 2.6 montre qu'une chaîne très peu rigide et une force ionique nulle permet au polyélectrolyte de totalement s'adsorber sur la particule. Une augmentation de la force ionique diminue cette adsorption et empêche à terme la complexation. De même lorsque la rigidité augmente, la chaîne est de plus en plus structurée sur la particule, formant des boucles larges. A terme cette rigidité couplée à une force ionique non nulle, empêche également la complexation. Dans le cas de polyélectrolytes faibles⁵⁰, il a été montré l'influence de la taille des chaînes et du pH sur les structures.

2.3.3 Les applications des assemblages polyélectrolyte-protéine

2.3.3.1 Relargage contrôlé de protéines

Une première application de systèmes polyélectrolyte-protéine est la possibilité d'immobiliser des protéines. Il est ensuite possible soit de les fixer soit de les relarguer suivant l'utilisation que l'on veut en faire.

Afin de permettre le relargage contrôlé de protéines, une possibilité est de les emprisonner via des polyélectrolytes dans un gel sensible à des stimuli. Nous avons vu dans la partie 2.1 que les polyélectrolytes de part leurs charges peuvent former des gels et ainsi absorber de grandes quantités d'eau. Nous avons également vu que cette capacité à former des gels est directement corrélée avec les conditions de pH, de force ionique ou encore de taux de charge du polyélectrolyte. Il est à noter qu'une application de champs électrique où un changement de pression osmotique sont également des facteurs qui peuvent engendrer une dégradation du gel et donc une libération de la protéine. Il est donc possible de former des gels qui vont emprisonner des protéines puis les libérer du fait d'un changement de conditions⁵⁵. Le pH permet ceci avec les polyélectrolytes possédant des groupements acides ou bases faibles. En effet dans ce cas, le pH fera changer le nombre d'unités chargées sur les chaînes et ainsi induira un changement dans le gel. De la même manière, une variation du taux de charge du polyélectrolyte (et donc du nombre maximal de monomères pouvant être chargés) fera varier la capacité à emprisonner les protéines et à les libérer. Ainsi un taux de charge moins élevé permettra un relargage plus important. Bromberg et Ron ont écrit une revue

[55] Peppas, N.; Leobandung, W. *J. Biomat. Sci.* **2004**, 15, 125-144.

faisant un panorama de ces gels répondant aux stimuli⁵⁶ et ont conclu sur la possibilité de leur future utilisation comme porteurs de protéines en médecine pour délivrer des protéines médicaments.

2.3.3.2 Biopuces et catalyseurs de surface

Il est également possible de fixer des protéines et de faire en sorte qu'elles le restent. C'est le cas lorsque le but est d'utiliser les protéines comme réactif ou catalyseur.

C'est le cas des biopuces. Une biopuce est un système qui réagit face à un stimulus biologique ou physiologique et permet donc de détecter la présence d'entités biologiques ou chimiques. Le substrat biologique greffé sur la puce réagit avec une substance et l'information est ensuite transmise via un système électronique. Dans notre cas, ce substrat biologique sera une enzyme immobilisée grâce à des polyélectrolytes sur cette puce. Il est nécessaire que l'immobilisation de cette enzyme soit stable sur une longue durée pour que le système soit utilisable et ainsi des études ont été menées pour améliorer la fixation des protéines sur les électrodes, notamment par Gibson et al.⁵⁷ et Chaniotakis⁵⁸. Chaniotakis a montré que l'utilisation de polyélectrolytes de hautes masses augmentait cette stabilité. Gibson et al. ont quant à eux montré que la formation d'un complexe polyélectrolyte-glucose oxydase sur la surface de la puce permettait d'augmenter sa stabilité mécanique et thermique. Enfin Yu et Caruso⁵⁹ ont montré l'utilité de l'utilisation de multicouches de PSS/PAH. En effet l'apport de cette couche de polyélectrolyte permet à l'enzyme de ne pas être en contact direct avec la puce et améliore sa tenue.

De même qu'une protéine peut réagir avec un substrat et ainsi donner une information, elle peut réagir sur de plus grandes quantités de substrat et donc être utilisée comme catalyseur biologique. Dans ce cas les protéines globulaires greffées sur des brosses de polyélectrolyte ou encore adsorbées sur des multicouches sont tout à fait adéquates. Citons en exemple des multicouches de PSS entre lesquelles sont adsorbées des β -glucosidase⁶⁰. Ces multicouches PSS- β -glucosidase sont elles-mêmes greffées sur une multicouche PAH/PSS déposée sur un latex de PS. Il a été montré qu'une augmentation du nombre de couches de β -glucosidase augmente le rendement de la réaction et donc que même les protéines situées dans les couches inférieures réagissent et également que le substrat (le dodécanol dans ce cas) est capable de les atteindre. De plus il a été montré que si le système est terminé par une couche de PSS alors

[56] Bromberg, L.; Ron, E. *Advanced Drug Delivery* **1998**, 31, 197-221.

[57] Gibson, T.; Pierce, B.; Hulbert, J.; Gillespie, S. *Sensors and Actuators B* **1996**, 33, 13-18.

[58] Chaniotakis, N. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, 378, 89 - 95.

[59] Yu, A.; Caruso, F. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 3031-3037.

[60] Caruso, F.; Fiedler, H.; Haage, K. *Colloids and Surfaces A* **2000**, 169, 287-293.

le rendement est également plus élevé par rapport à un système terminé par une couche de β -glucosidase. L'explication pour ce phénomène est que cette dernière couche de PSS empêche les protéines de s'échapper dans la solution et ainsi être moins efficaces.

2.3.3.3 Encapsulation

La coacervation est utilisée de manière courante pour encapsuler des arômes par exemple en agro-alimentaire. Cependant le champ des utilisations possibles ne s'arrête pas là et il est possible d'envisager cette méthode pour encapsuler des molécules médicaments, voire des vaccins. Il s'agit ici également de sujets très porteurs.

2.3.3.4 Séparation de protéines

Enfin une dernière utilisation du système polyélectrolyte-protéine est la séparation de protéines. Il s'agit là d'une des premières utilisations du système qui a d'ailleurs motivé les premières études sur celui-ci. En effet en choisissant de manière judicieuse un polyélectrolyte il est possible de séparer et d'extraire une protéine de son mélange. Il faut pour cela considérer la sélectivité du polyélectrolyte envers la protéine cible et un moyen de purification ultérieur si le but est de récupérer la protéine et pas seulement de l'extraire. Izmurudov et al.⁶¹ ont publié une revue dans laquelle ils reviennent sur ces paramètres en fonction des protéines et des polyélectrolytes considérés. Un exemple qui peut être cité est l'étude menée par Dainak et al.⁶² dans laquelle les auteurs ont greffé un antigène sur du poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide) afin de l'immobiliser. De cette manière, des solutions d'anticorps ont pu être purifiées, les anticorps actifs étant retenus par l'antigène et les inactifs ne l'étant pas.

[61] Izumrudov, V.; Galaev, I.; Mattiasson, B. *Bioseparation* **1998**, 7, 207-220.

[62] Dainiak, M.; Muronetz, V.; Izumrudov, V.; Galaev, I.; Mattiasson, B. *Analytical Biochemistry* **2000**, 277, 58-66.

Chapitre 3

La Diffusion de Neutrons aux Petits Angles

La principale technique expérimentale que nous avons utilisé au cours de cette thèse est la diffusion de neutrons aux petits angles. Nous allons donc détailler cette technique dans ce chapitre. Les autres techniques expérimentales utilisées seront détaillées au fur et à mesure des chapitres.

3.1 Le neutron

Le neutron a été découvert en 1932 par James Chadwick et a été utilisé pour la première fois comme sonde en 1946 par Clifford Shull. Il est à la fois une onde et une particule ce qui fait de lui un puissant outil d'investigation. Il possède une longueur d'onde qui suit la relation suivante :

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (3.1)$$

où h est la constante de Planck, m la masse du neutron et v sa vitesse.

Mais étant également une particule, son énergie correspond à son énergie cinétique et est donnée par la relation :

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} \quad (3.2)$$

avec k le nombre d'onde ($k = 2\pi/\lambda$). Cette expression nous donne l'énergie en joules. Pour l'obtenir en électron-volt on utilise l'expression suivante :

$$E = \frac{\hbar^2}{2m\lambda^2} \quad (3.3)$$

Lorsque les neutrons sont produits par un réacteur, les neutrons utilisés pour l'étude de

la matière molle sont des neutrons produits par une source froide dont la longueur d'onde se situe typiquement entre 3 et 25 Å ce qui aboutit à une fenêtre d'énergie située entre 10^{-1} et 10 meV. Pour information, les rayons X possèdent eux une énergie de l'ordre du keV soit 6 ordres de grandeur de plus. Du fait de cette gamme d'énergie, les neutrons permettent à la fois de sonder les structures par des phénomènes d'interférence mais également la dynamique par spectroscopie.

3.2 L'interaction neutron-matière

Nous allons ici introduire les interactions neutron-matière. Nous n'entrerons pas trop dans les détails, plus d'informations peuvent être trouvées dans la littérature^{63,64}. Considérons un faisceau de neutrons monochromatique de longueur d'onde λ qui est considéré comme une onde plane. Sa propagation peut s'écrire :

$$\psi = e^{i(kz - 2\pi\nu t)} \quad (3.4)$$

avec ν la fréquence de l'onde.

Après interaction avec l'échantillon, celui-ci émet une onde diffusée sphérique :

$$\psi_{dif} = -f(\vec{k}, \vec{k}') \frac{e^{i(kz - 2\pi\nu t)}}{r} \quad (3.5)$$

avec $-f(\vec{k}, \vec{k}')$ l'amplitude de diffusion de la dimension d'une longueur qui caractérise la force de l'interaction, \vec{k}' étant le vecteur d'onde de l'onde diffusée. La différence entre le vecteur d'onde incident et le vecteur d'onde est le vecteur de diffusion :

$$\vec{q} = \vec{k} - \vec{k}' \quad (3.6)$$

Afin de caractériser la diffusion, on considère une section efficace de diffusion. Ce paramètre est obtenu lorsque l'échantillon reçoit un flux de neutrons $\Phi(\lambda)$ en $cm^{-2}s^{-1}$ et qu'il diffuse un nombre de neutrons $I(\Theta)$ en s^{-1} sur une surface S située à une distance r (soit dans un angle solide $\Delta\Omega = S/r^2$).

$$I(\Theta) = \Phi(\lambda) \frac{d\sigma(\Theta)}{d\Omega} \Delta\Omega \quad (3.7)$$

[63] Lindner, P. *North Holland, édité par P. Lindner et T. Zemb* **2002**, 23.

[64] Cotton, J. P. *Journal De Physique Iv* **1999**, 9, 21-49.

Soit :

$$I(q) = \Phi(\lambda) \frac{d\sigma}{d\Omega} \Delta\Omega \quad (3.8)$$

Cette section efficace est homogène à une surface. Elle est exprimée en barns et est indépendante de la longueur d'onde. Elle est divisée par le volume de l'échantillon et devient donc homogène à des cm^{-1} et se réécrit :

$$\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega} = \langle A(q)A(-q) \rangle = \sum_{i,j}^{n,n} \langle \rho_i \rho_j \rangle \langle e^{iq(r_i - r_j)} \rangle \quad (3.9)$$

où l'amplitude de diffusion $A(q) = \int \rho(r) e^{iqr} dr$ est la transformée de Fourier de la densité de longueur de diffusion $\rho(r) = \frac{1}{V} \sum_i^n b_i \delta(r - r_i)$, le volume V contenant n noyaux de longueur de diffusion b_i . Les brackets indiquant une moyenne sur l'ensemble de l'échantillon. On peut finalement écrire :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = nb_{inc}^2 + b^2 \sum_{i,j}^{n,n} \langle e^{iq(r_i - r_j)} \rangle \quad (3.10)$$

avec $b_{inc}^2 = \langle b_i^2 \rangle - \langle b_i \rangle^2$ et $b = b_{coh} = \langle b_i \rangle$.

L'intensité totale diffusée est la somme de deux termes : le premier terme est le terme de diffusion incohérente lié à l'écart quadratique moyen des longueurs de diffusion b_{inc}^2 et le second le terme de diffusion cohérente qui représente les corrélations spatiales collectives entre les objets diffusants. Le terme incohérent représente les dynamiques individuelles de chaque centre diffuseur non corrélé avec un autre. Le terme incohérent est dû à des fluctuations de b_i qui sont elles-même dues à deux phénomènes : le premier est le désordre isotopique qui vient du fait que chaque isotope possède sa propre longueur de diffusion b et qui implique donc l'existence d'une moyenne pour un élément donné. Le second est le spin nucléaire dont la répartition est aléatoire si l'échantillon et le faisceau incident ne sont pas polarisés (ce qui sera le cas dans nos expériences de DNPA).

De manière générale, les mesures de diffusion incohérente servent à déterminer la dynamique au sein d'un système du fait du caractère individuel des corrélations. A l'inverse les mesures de diffusion cohérente servent à déterminer les structures au sein d'un système. Il sera donc nécessaire dans notre cas d'évaluer la diffusion incohérente qui, étant indépendante de q comme on peut le voir dans l'équation 3.9 sera considérée comme un bruit de fond constant. Ce bruit de fond sera ensuite retiré du signal total pour obtenir uniquement la diffusion cohérente.

3.3 Le contraste

3.3.1 Notion de contraste

Afin de mesurer le signal d'un objet, il est nécessaire que celui-ci ait un contraste avec le milieu dans lequel il se trouve. Dans notre cas, les mesures ont toujours été effectuées en solution, il était donc nécessaire que les objets que nous voulions sonder aient un contraste envers l'eau. Le contraste se définit par une différence de densité de longueur de diffusion ρ . Cette densité se calcule à partir de la densité de l'objet, de sa masse molaire et de la somme des longueurs de diffusion cohérentes des atomes le composant :

$$\rho = \frac{\sum_0^i b_i d N}{M} \quad (3.11)$$

avec b_i les différentes longueurs de diffusion cohérentes, d la densité de l'objet, M sa masse molaire et N le nombre d'avogadro.

Le contraste, qui intervient au carré dans l'intensité diffusée, s'écrit :

$$\Delta\rho^2 = (\rho_1 - \rho_2)^2 \quad (3.12)$$

où ρ_1 est la densité de longueur de diffusion de l'objet et ρ_2 celle du milieu.

Les valeurs de densité de longueur de diffusion s'expriment généralement en 10^{-10} cm^{-2} . Nos mesures étant toutes faites en milieu aqueux, nous donnerons ici les valeurs de densité de longueur de diffusion pour l'eau. L'eau légère H_2O possède une densité de longueur de diffusion de $-0.56.10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ et l'eau lourde D_2O possède une densité de longueur de diffusion de $6.33.10^{-10} \text{ cm}^{-2}$. La grande différence entre ces deux valeurs est due à l'hydrogène qui suivant son état isotopique (^1H ou ^2H) possède une longueur de diffusion négative ou positive. Ceci est lié au fait que l'interaction neutron-matière peut être attractive ou négative, contrairement à l'interaction rayon X - matière. Cette propriété fait de la diffusion de neutrons une technique très adaptée pour la mesure d'objet organiques et donc possédant beaucoup d'hydrogène. En effet, pour un système qui doit être mesuré en solution aqueuse, il sera judicieux de se placer dans un solvant qui possède une densité de longueur de diffusion la plus éloignée possible de l'objet sondé afin de maximiser le contraste et donc le signal total mesuré, qui est proportionnel au carré à cette différence. Ainsi un objet hydrogéné (par exemple notre polyélectrolyte seul) sera mesuré dans l'eau lourde afin de maximiser son contraste.

3.3.2 Variation de contraste

Nous venons de voir que le signal mesuré est directement lié au contraste neutronique entre l'objet et le solvant. Cependant dans un cas de mélange à trois composants (deux objets et le solvant par exemple), il y aura trois contrastes différents entre les composants, amenant un signal contenant les contributions des deux objets par rapport au solvant et entre eux. Afin d'éviter ce problème il est possible d'utiliser la variation de contraste via un marquage isotopique. Nous venons de voir que l'hydrogène et le deutérium ont des longueurs de diffusion très différentes et la variation de contraste se sert de cette propriété pour masquer un des composants. La condition nécessaire pour cette expérience est que les densités de longueur de diffusion des deux objets mesurés se situent entre celles de l'eau lourde et légère et assez loin l'une de l'autre pour que le contraste soit assez élevé. Il suffit ensuite de faire un mélange D_2O/H_2O dans des proportions telles que ce mélange atteigne la densité de longueur de diffusion d'un des composants, celui-ci perdant son contraste avec le solvant, il ne reste plus que le contraste de l'autre objet envers le solvant et donc la mesure ne concernera plus que lui.

Prenons pour exemple les objets utilisés lors de notre étude. Le polyélectrolyte deutérié possède une densité de longueur de diffusion égale à celle de l'eau lourde, le fait de le mettre en solution dans un solvant 100% D_2O le masquera donc. De même le polyélectrolyte hydrogéné possède une densité de longueur de diffusion égale à un mélange 43% $D_2O/57\% H_2O$ et ainsi un tel mélange masquera donc son signal. Une propriété à noter ici pour notre système est que le lysozyme (que nous n'avons que sous forme hydrogénée) possède également une densité de longueur de diffusion égale à un mélange 43% $D_2O/57\% H_2O$. Cette propriété de symétrie est particulièrement intéressante. Elle permet en effet de réaliser des mélanges de protéines, de chaînes hydrogénées et de chaînes deutériées pour ne faire apparaître que certaines chaînes dans un mélange 43% $D_2O/57\% H_2O$. Ceci permet de mesurer le facteur de forme du polyélectrolyte dans les complexes comme nous le verrons en 3.6.2. Il est également possible d'éteindre à la fois le signal des protéines et des chaînes pour ne faire apparaître que les contre-ions s'ils ont un contraste suffisant par rapport au mélange. L'ensemble des mesures possibles est résumé sur la figure 3.1.

3.4 Mesure et traitement des données

3.4.1 Spectromètres de DNPA

Penchons nous maintenant plus précisément sur le côté technique de la Diffusion de Neutrons aux Petits Angles (DNPA).

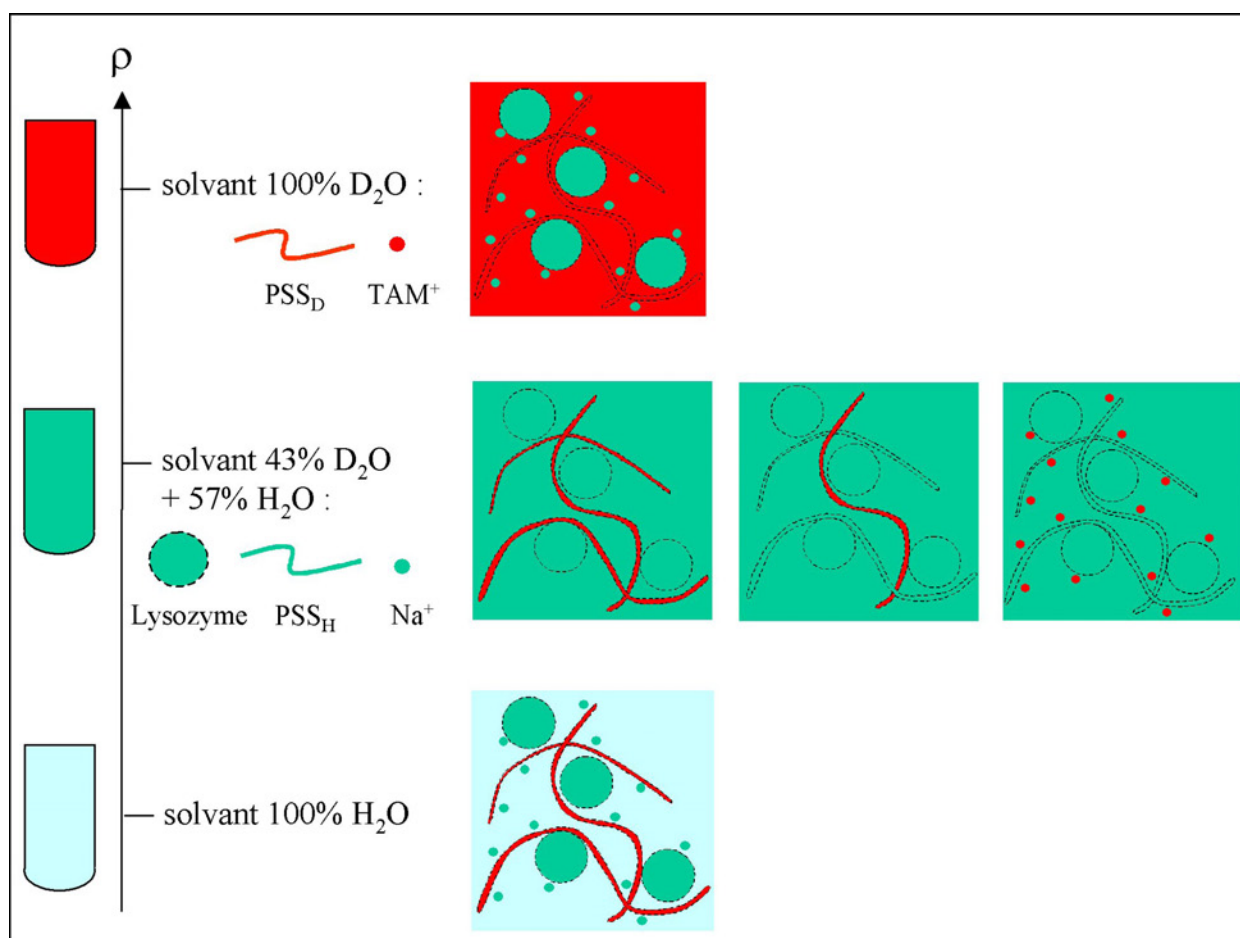


FIG. 3.1 – Représentation schématique des possibilités de variation de contraste

Un faisceau de neutrons monochromatiques est collimaté et envoyé sur l'échantillon. Les neutrons sont ensuite diffusés par l'échantillon dans plusieurs directions (voir fig 3.2). Si l'échantillon est isotrope alors nous obtiendrons plusieurs angles solides de diffusion, chacun étant centré sur la direction du faisceau incident. Les neutrons sont ensuite mesurés par un détecteur en fonction de leur position au centre. Cette position donne l'angle de diffusion et de là la valeur du vecteur de diffusion q tel que :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\Theta) \quad (3.13)$$

Les détecteurs sont soit un croisement de fils horizontaux et verticaux (détecteurs XY), soit des anneaux (détecteur centré). Ces détecteurs sont dans une atmosphère de BF_3 , gaz qui permet de capter les neutrons et de réémettre un gamma qui va créer une différence de potentiel entre les fils et donc être détecté. Pour des échantillons isotropes un regroupement est ensuite effectué pour sommer tous les neutrons comptés à une même distance du centre (cette opération n'est nécessaire qu'avec des détecteurs XY). On obtient donc une courbe d'intensité en fonction de q . Pour faire varier les valeurs de q deux choix sont possibles, varier la distance ou la longueur d'onde. Les longueurs d'onde sont comprises entre 4 et 25 Å et les distances entre 1 m et 7 m généralement (jusqu'à 40 m à l'ILL). Les valeurs extrêmes de q ainsi atteintes sont donc de l'ordre de 1.10^{-3} à 0.5 Å^{-1} . Pour relier à des distances réelles, cela donne une fenêtre de mesure d'objets de taille comprise entre 10 et 10000 Å environ. Pour couvrir une gamme importante de vecteurs d'onde, il est nécessaire de faire la mesure en plusieurs configurations, une courte distance et petite longueur d'onde pour les grandes valeurs de q et une longue distance et une grande longueur d'onde pour les petits q .

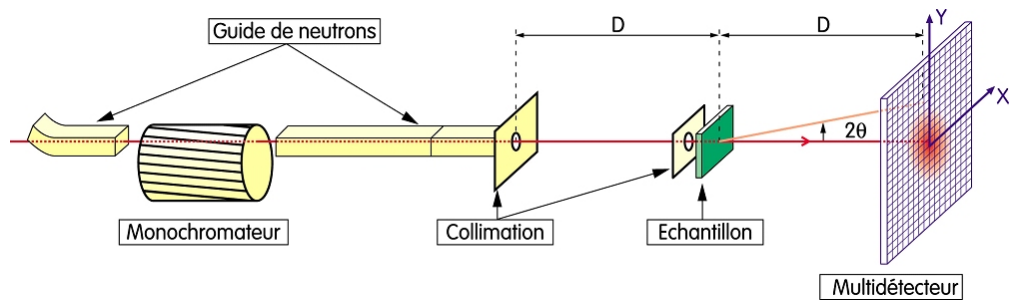


FIG. 3.2 – Schéma d'un appareil de diffusion de neutrons aux petits angles

Nous avons utilisé des spectromètres de trois centres de neutrons : le Laboratoire Léon Brillouin à Saclay, l'Institut Laue Langevin à Grenoble et l'Hahn Meitner Institut à Berlin.

A Saclay nous avons utilisé les spectromètres PAXY, PAXE et PACE. PAXY et PAXE sont deux spectromètres à détecteurs XY dont les gammes en q utilisées ont été respectivement 5.10^{-3} à 0.35 Å^{-1} et 3.10^{-3} à 0.4 Å^{-1} généralement.

A Grenoble nous avons utilisé le spectromètre D11 qui possède un bidon de 35 m et permet donc des mesures à très petits q . La gamme utilisée sur ce spectromètre a été 2.10^{-3} à 0.35 \AA^{-1} et quelques mesures ont été effectuées jusqu'à $7.5.10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$. Nous avons également utilisé le spectromètre D22 et utilisé une gamme en q de 1.10^{-3} à 0.5 \AA^{-1} . Dans les deux cas notre local contact sur place a été Bruno Demé.

Enfin à Berlin nous avons utilisé le spectromètre V4 et utilisé une gamme en q de $3.5.10^{-3}$ à 0.35 \AA^{-1} . Nos local contacts ont été Jörg Haug et Daniel Clemens.

3.4.2 Traitement des données

Une fois l'acquisition effectuée, un traitement des données brutes est nécessaire afin d'obtenir la mesure finale. Il faut tout d'abord soustraire la diffusion due à la cellule utilisée qui est en quartz et dont les joints de grain diffusent notamment aux petits q . Il faut ensuite tenir compte du fait que les détecteurs n'ont pas tous la même efficacité. Pour cela il faut mesurer un incohérent pur (par exemple de l'eau légère) qui va diffuser de manière égale dans toutes les directions et possède donc théoriquement un signal plat. La mesure de l'échantillon sera donc ensuite divisée par ce signal d'incohérent pour faire disparaître les fluctuations dues à l'efficacité du détecteur. A ce moment est obtenue une mesure normée par rapport à l'eau. Il suffit ensuite de mesurer le $d\sigma/d\Omega$ de l'eau et de multiplier le signal par ce facteur pour revenir en intensités absolues.

$$I_{abs} = \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{H_2O} \times \left(\frac{\frac{I_{ech}}{T_{ech}.d} - \frac{I_{cv}}{T_{cv}.d}}{\frac{I_{H_2O}}{T_{H_2O}.d} - \frac{I_{cv}}{T_{cv}.d}} \right) \quad (3.14)$$

Avec T les différentes transmissions et d les différentes épaisseurs de cellule.

Pour obtenir $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{H_2O}$ une mesure est nécessaire. Néanmoins pour nous affranchir de cette mesure et obtenir tout de même ce facteur, nous avons systématiquement mesuré une solution de lysozyme à 10 g/L dont le signal en intensité absolue a été déterminé (présenté en 3.6.1). Ainsi nous pouvons à chaque série de mesure retrouver le facteur à imposer aux intensités mesurées, ce facteur incluant une constante d'appareil en plus de la section efficace de l'eau.

Enfin la dernière opération consiste à soustraire la partie incohérente du signal. Pour cela le solvant est mesuré seul ou avec les éventuels sels ou tampons pH. Cette mesure donne le bruit de fond incohérent qui est indépendant de q et peut donc être soustrait directement du signal.

3.5 L'intensité diffusée

Lorsque les traitements des données brutes sont achevés, on obtient un signal en intensité absolue uniquement constitué de diffusion cohérente. C'est cette diffusion qui va nous permettre d'obtenir des informations sur la forme et l'organisation des objets dans la solution.

L'expression générale de l'intensité diffusée par des objets de forme quelconque en régime concentré dans un milieu continu fait intervenir un facteur de forme (qui décrit la taille et la géométrie des objets) et un facteur de structure qui décrit les corrélations entre objets dans le système.

Dans le cas où les objets ne sont pas centrosymétriques (cas des solutions de polyélectrolyte), il est difficile de dissocier forme et structure car on retrouve des corrélations entre diffuseurs appartenant à des mêmes objets et à des objets différents à toutes les échelles (et donc à tous les q sondés). Il faut alors utiliser des techniques de variations de contraste pour dissocier forme et structure (cf 3.6.2).

Lorsque les objets sont centrosymétriques, l'expression de l'intensité diffusée peut être réécrite sous la forme :

$$I(q) = \Phi \Delta \rho^2 V P(q) S(q) \quad (3.15)$$

avec Φ la fraction volumique en objets diffusants, $\Delta \rho^2$ le contraste entre les objets et le solvant, V le volume d'un objet, $P(q)$ le facteur de forme des objets et $S(q)$ le facteur de structure de ces objets.

3.5.1 Facteur de forme : $P(q)$

Le facteur de forme est fonction de la forme d'un objet individuel. Il est directement fonction des positions des diffuseurs élémentaires au sein de celui-ci.

Le facteur de forme tend toujours vers 1 aux petits q . Si le système est en régime dilué et que les objets sont assez dispersés pour ne pas avoir d'interaction entre eux, alors le facteur de structure est lui aussi égal à 1 et la mesure de l'intensité à petits q est directement fonction des préfacteurs et permet d'atteindre une taille caractéristique, le rayon de giration, ainsi que la masse via la densité pour les objets diffusants. Un exemple de mesure de cette limite à petits q est donné dans le paragraphe 3.6.1 pour le cas de la protéine en régime dilué.

Différents facteurs de forme typiques existent suivant le type d'objet considéré. Nous donnons ici des exemples pour quelques objets simples, expressions que nous retrouverons dans l'étude. Plus de détails peuvent être trouvés dans l'article DNPA de Cotton⁶⁴.

Sphère

Une sphere de rayon R a pour facteur de forme l'expression suivante :

$$P(q) = \left(\frac{3(\sin(qR) - qR\cos(qR))}{(qR)^3} \right)^2 \quad (3.16)$$

Cette fonction possède dans la zone de décroissance (moyens et grands q) des oscillations dues aux fonctions sinus et cosinus.

Si $qR \ll 1$, alors un développement limité donne :

$$P(q) = 1 - \frac{(qR_g)^2}{3} \text{ avec } R_g^2 = 3/5R^2 \quad (3.17)$$

On se retrouve alors dans le régime de Guinier qui permet de mesurer le rayon de giration d'un objet.

De même si $qR \gg 1$, $\sin qR \approx \cos qR \approx 1/2$ et alors on obtient :

$$P(q) \propto 9/2(qR)^4 \quad (3.18)$$

On parle alors de régime de Porod et on observe une diffusion en q^{-4} typique des interfaces abruptes. Cette expression permet de mesurer une surface spécifique pour l'objet.

De même que dans le cas des chaînes gaussiennes, un bon moyen de représenter un facteur de forme de protéine est une représentation en $q^4 I(q)$.

Chaîne gaussienne

Une chaîne gaussienne correspond à une chaîne qui effectue une marche aléatoire dont le déplacement carré moyen $\langle r^2 \rangle$ proportionnel au nombre N de pas de longueur a . La distance entre les extrémités est nulle en moyenne mais sa distribution suit une loi gaussienne. Ainsi le facteur de forme d'une chaîne gaussienne s'écrit :

$$P(q) = \frac{2(e^{-X} - 1 + X)}{X^2} \text{ avec } X = q^2 R_g^2 \quad (3.19)$$

Pour mieux représenter cette fonction, on utilise une représentation en $q^2 I(q)$ qui est appelée représentation de Kratky.

Chaîne à volume exclu

Une chaîne à volume exclu est une structure moins compacte que la chaîne gaussienne. L'origine est un gonflement dû à des effets de solvant. Elle est très inhomogène et ne possède pas de facteur de forme connu. Néanmoins il est généralement accepté que son facteur de forme aux q intermédiaires varie tel que :

$$P(q) \propto q^{-1.7} \quad (3.20)$$

Chaîne à longueur de persistance

Ce facteur de forme est un peu plus complexe et sera défini lors la mesure du facteur de forme des chaînes de PSS dans le chapitre 3, le modèle des chaînes à longueur de persistance s'appliquant aux chaînes de PSS en solution.

3.5.2 Facteur de structure : $S(q)$

Le facteur de structure quant à lui permet de caractériser l'état de dispersion des objets dans le milieu. Il permet de mettre en lumière les attractions (états d'agréations), les répulsions (mesure du second coefficient du viriel), l'intensité des interactions, la compressibilité osmotique, etc... Il est par définition égal à 1 aux grands q , soit à l'échelle des objets individuels, puisqu'une organisation n'a de sens qu'à partir d'une échelle supérieure à la taille d'un objet.

3.5.3 Signal total

Le schéma de la figure 3.3 résume les concepts de facteurs de forme et de structure. Y sont représentés des objets dispersés dans un milieu. L'intensité totale représentée en rouge est le produit du facteur de forme représenté en bleu et du facteur de structure représenté en vert. On voit sur cette représentation que jusqu'à une échelle égale à la taille de l'objet, celui-ci est composé d'éléments diffuseurs (ses différents atomes) et le facteur de forme domine puis à une échelle supérieure les objets sont considérés comme des centres diffusants discrets et c'est cette fois le facteur de structure qui domine l'intensité. On voit également que le plateau de diffusion du facteur de forme permet de déterminer une taille d'objet (à $q = 1/R$) et que le pic de corrélation du facteur de structure permet de déterminer une distance caractéristique entre objets (à $q = 2\pi/D$).

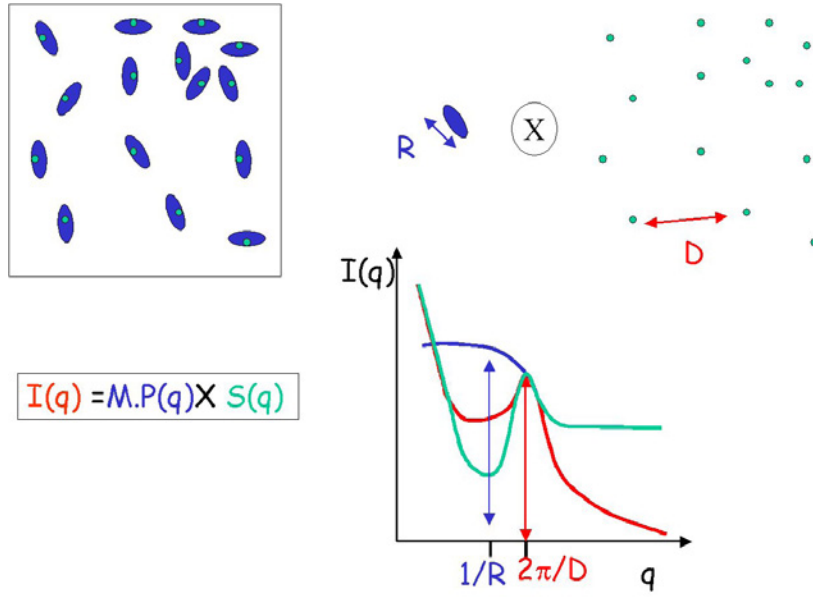


FIG. 3.3 – Représentation schématique de l'intensité totale d'un signal de diffusion de neutrons aux petits angles.

3.6 Diffusion aux petits angles de solutions d'objets composants le mélange

3.6.1 Le lysozyme

Le lysozyme est mesuré dans un solvant 100% D_2O afin de maximiser le contraste avec le solvant et donc le signal. Le signal obtenu est présenté sur la figure 3.4.

Lorsque qu'il est mesuré à 10 g/L, le lysozyme est en régime dilué et la mesure de cet échantillon permet de déterminer son facteur de forme et la limite aux petits q permet de déterminer le volume d'une protéine. Le lysozyme est une protéine globulaire et donc la mesure de son facteur de forme est faite via le modèle des sphères. L'équation 3.15 s'applique donc dans ce cas. De plus comme nous sommes en régime dilué, $S(q) = 1$ sur toute la gamme en q et l'équation 3.15 se réécrit donc en remplaçant la fraction volumique par la densité de la protéine :

$$I(q) = dV\Delta\rho^2VP(q) \quad (3.21)$$

Avec d la densité de la protéine

Lorsque q tend vers 0 le facteur de forme tend vers 1 et donc on obtient en remplaçant la densité :

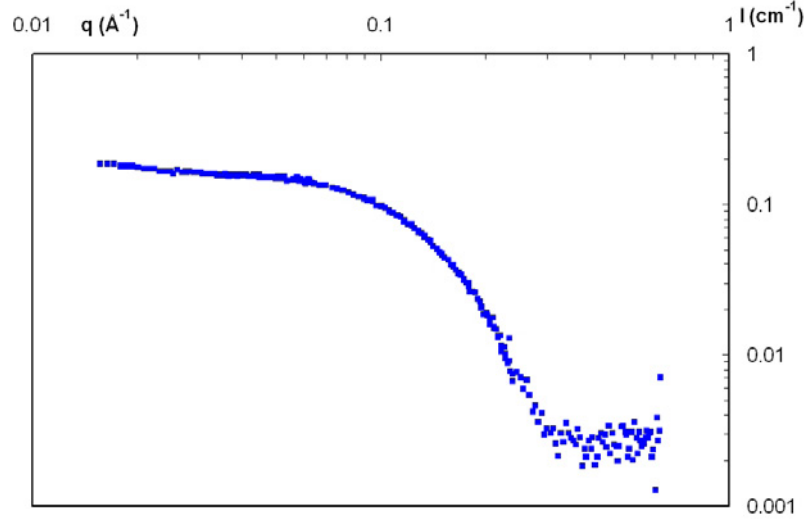


FIG. 3.4 – Facteur de forme du lysozyme à 10 g/L

$$I(0) = \frac{C\mathcal{N}_a}{M} \Delta\rho^2 V^2 \quad (3.22)$$

Avec C la concentration en protéine en g/cm³, \mathcal{N}_a le nombre d'Avogadro et M la masse molaire du lysozyme.

La mesure de la solution de lysozyme à 10 g/L donne une intensité $I(0)$ égale à 0.15 cm⁻¹, ainsi comme nous connaissons également le contraste qui vaut $\Delta\rho^2 = 1.49 \cdot 10^{21}$ cm⁻⁴ et la masse molaire de la protéine $M = 14300$ g/mol il vient :

$V = 1.5 \cdot 10^{-20}$ cm³ soit 15000 Å³. La littérature donne pour le lysozyme une forme ellipsoïdale de taille (30 × 30 × 45 Å), soit un volume de 21200 Å³. Le lysozyme étant une protéine à deux lobes, le volume occupé est donc inférieur et la valeur de 15000 Å³ paraît tout à fait cohérente.

De plus cette mesure permet de connaître la fraction volumique pour une concentration donnée, on trouve :

$$\Phi = 0.63C$$

Concernant les caractéristiques de la courbe de diffusion, la diffusion à plus grands q suit une loi de décroissance en q^{-4} typique des sphères polydisperses comme nous venons de le voir. La protéine ne possède pas, par définition, de distribution en taille mais le fait que ce ne soit pas une sphère parfaite induit une polydispersité effective et donc les oscillations du facteur de forme n'apparaissent pas. Il est possible de représenter ce même signal en $q^4 I(q)$ afin de mieux observer cette diffusion.

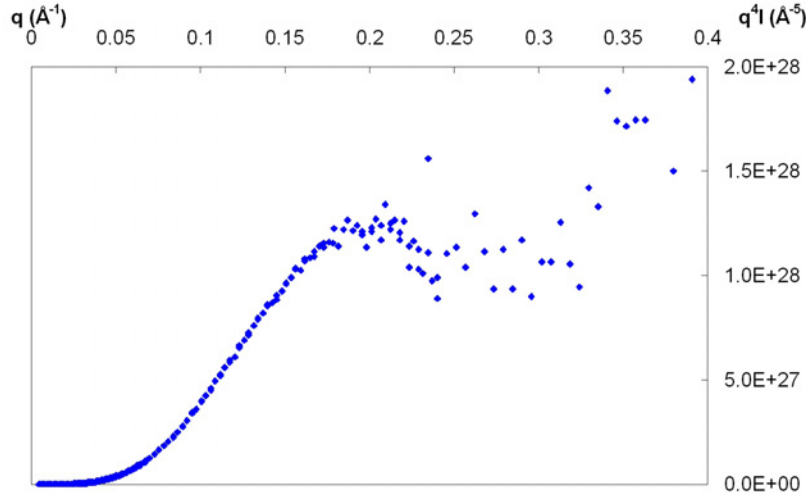


FIG. 3.5 – Facteur de forme du lysozyme à 10 g/L en représentation $q^4I(q)$

Sur la figure 3.5 on observe à 0.19 \AA^{-1} environ un pic puis à plus grands q un plateau (limité par la résolution à cette valeur de vecteur d'onde). Ce sont là les caractéristiques d'une diffusion en q^{-4} de sphères légèrement polydisperses.

3.6.2 Le PSSNa

Nous allons maintenant détailler le cas des chaînes de PSS, dans un premier temps en décrivant leurs courbes de diffusion caractéristiques puis dans un second temps nous expliquerons comment déterminer son facteur de forme. En effet comme il l'a été dit ci-dessus, pour des objets non-centrosymétriques il n'est pas possible de décorréler facteur de forme et facteur de structure de manière directe.

3.6.2.1 Solutions pures de PSSNa

Les chaînes de PSSNa seules en solution sont mesurées dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O afin d'avoir des témoins lors des mesures dans les mélanges protéine-polyélectrolyte. Ce mélange eau légère eau lourde correspond en effet à la densité de longueur de diffusion de la protéine ce qui permettra d'éteindre son signal lors des mesures de complexes. La figure 3.6 montre les signaux des chaînes de PSSNa mesurées seules à deux concentrations (0.1 M et 0.3 M) ainsi qu'à deux taux de charge de PSSNa ($f = 0.5$ et $f = 1$)

Dans ces signaux se trouvent un facteur de forme et un facteur de structure. En effet les chaînes dans ces conditions sont en régime semi-dilué et des interactions inter-chaînes induisent un facteur de structure à l'inverse du cas de la protéine qui était assez diluée pour ne pas y être sensible.

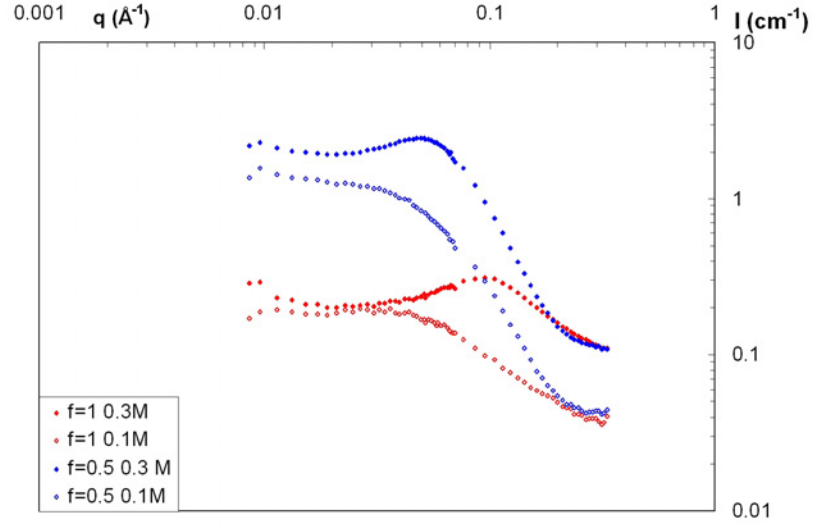


FIG. 3.6 – Courbes DNPA pour le PSSNa seul à deux concentrations et deux taux de charge

Les quatre courbes mesurées présentent les caractéristiques des courbes de diffusion des chaînes. Tout d'abord à grands q , le taux de charge du polyélectrolyte définit la pente de diffusion. Si celui-ci est égal à 1, alors le polyélectrolyte se comporte aux petites échelles comme un bâton et donc la diffusion suit un facteur de forme de type bâton, soit une pente en q^{-1} . Lorsque le taux de charge n'est que 0.5, alors la pente est plus importante (une décroissance de l'ordre de q^{-2}). Ceci est dû au fait que les chaînes peuvent présenter des parties hydrophobes et que le signal est un mélange de facteur de forme de bâton (q^{-1}) et de perles (q^{-4}). Il est possible ensuite d'observer un pic polyélectrolyte (ou tout du moins un épaulement pour les concentrations de 0.1 M) dont la position est définie par la concentration en chaînes et le taux de charge. Ce pic provient du réseau transitoire formé par les chaînes chargées en solution. En effet le fait que les chaînes se repoussent par répulsion électrostatique organise les chaînes en un réseau et donc la présence d'une distance caractéristique ξ qui induit un pic à une valeur $q = \frac{2\pi}{\xi}$. Ce pic varie selon la concentration en $C^{1/2}$ du fait que nous soyons en régime semi-dilué et en $f^{2/7}$.⁶⁵ Si nous nous trouvons en régime dilué alors le taux de charge n'a plus d'influence sur la position du pic qui varie cette fois en $C^{1/3}$.

3.6.2.2 Facteur de forme du PSSNa

Le facteur de forme du PSSNa n'est pas facile à atteindre. En effet les chaînes étant chargées, elle forment un réseau en solution qui, comme nous venons de le voir, induit un facteur de structure. Le seul moyen de l'obtenir serait de travailler à des concentrations

[65] Combet, J.; Isel, F.; Rawiso, M.; Boue, F. *Macromolecules* **2005**, 38, 7456-7469.

si faibles que les chaînes n'interagissent plus et que donc le facteur de structure n'ait plus d'influence. Cependant contrairement au cas des protéines, le facteur de forme des chaînes est dépendant de son état de dilution. Donc changer celui-ci pour ne plus observer de structure revient à changer également le facteur de forme et donc la mesure n'a plus de sens. L'obtention de ce facteur de forme demande donc un peu d'astuce.

Le moyen le plus simple de l'obtenir est de jouer sur le contraste. Comme nous l'avons vu en 3.3.2, il est possible d'effectuer une variation de contraste pour masquer un objet dans un mélange via le solvant. Ici nous avons utilisé des chaînes de PSSNa deutériées et hydrogénées. Les figures 3.7 et 3.8 schématisent le système obtenu. Dans le cas de la figure 3.7, nous voyons une solution de chaînes de PSSNa en régime semi-dilué dans un solvant dont la densité de longueur de diffusion est différente de celle des chaînes deutériées et hydrogénées.

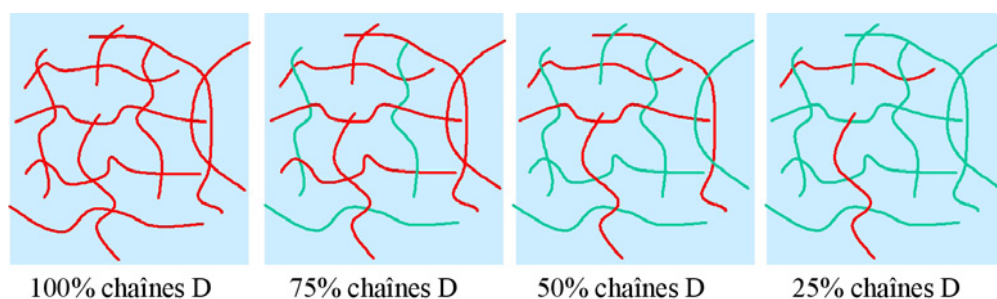


FIG. 3.7 – Mélange de chaînes hydrogénées et deutériées en solvant hydrogéné.

Cette représentation montre une concentration fixe en chaînes et différents taux de chaînes deutériées. Le but de ces mélanges est de diminuer au fur et à mesure le nombre de chaînes deutériées afin qu'elles interagissent de moins en moins avec d'autres chaînes deutériées. Sur cette représentation on voit également que le fait de changer ce taux ne change en rien le mélange et donc la physique qui s'y déroule.

Sur la figure 3.8 maintenant, on voit les mêmes mélanges que précédemment mais dans un solvant qui est égal à la densité de longueur de diffusion des chaînes hydrogénées (43% D_2O / 57% H_2O). Cette fois, les chaînes hydrogénées sont cachées et donc artificiellement il est possible de réduire le nombre de chaînes qui se voient tout en ne changeant pas la physique du système puisque la concentration totale en chaînes reste la même.

Nous avons décidé de limiter en taux minimal de chaînes marquées 25 % car sinon la concentration en chaînes donnant du signal devient si faible que l'obtention d'un signal de diffusion de neutrons est quasi impossible ou alors les temps d'acquisition deviendraient farfelus.

Le principe même de l'expérience, une fois ces notions de contraste et de concentration

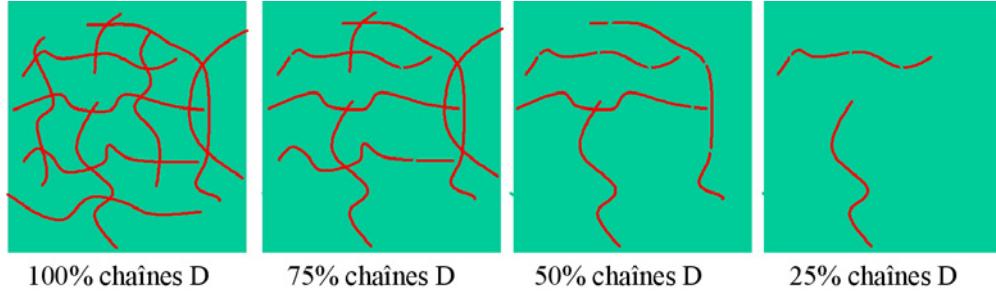


FIG. 3.8 – Mélange de chaînes hydrogénées et deutériées en solvant 43% D₂O / 57% H₂O

définies, est le suivant et est basé en partie sur la technique dite de ZAC (Zero Average Contrast)⁶⁵. Dans une solution contenant un mélange de chaînes H et D, on peut écrire l'intensité diffusée de la manière suivante :

$$I(q) = k_H^2 S_{HH}(q) + k_D^2 S_{DD}(q) + 2k_H k_D S_{HD}(q) \quad (3.23)$$

Cette equation tient en compte les interactions entre les chaînes deutériées, entre les chaînes hydrogénées et enfin entre les chaînes de différents isotopes H et D. Il est possible de réécrire ces fonctions en tenant compte de la fraction volumique ϕ de chaînes deutériées. Le signal intrachânes est appelé $S_{1D}(q)$ et le signal interchaînes est appelé $S_{2DD}(q)$. On obtient donc :

$$S_{DD}(q) = \phi S_{1D}(q) + \phi^2 S_{2DD}(q) \quad (3.24)$$

$$S_{HH}(q) = (1 - \phi) S_{1H}(q) + (1 - \phi)^2 S_{2HH}(q) \quad (3.25)$$

$$S_{HD}(q) = \phi(1 - \phi) S_{2HD}(q) \quad (3.26)$$

Dans notre cas, le solvant choisi fait que les équations 3.25 et 3.26 sont nulles, les chaînes hydrogénées n'ayant pas de contraste avec le solvant. On obtient donc un signal qui est uniquement fonction des chaînes deutériées. L'équation 3.24 possède donc deux termes dont un est le facteur de forme puisque fonction du signal intrachânes et l'autre le facteur de structure puisque fonction du signal interchaînes. C'est donc en faisant varier ϕ que nous allons déterminer les deux paramètres $S_{1D}(q)$ et $S_{2DD}(q)$. Cette mesure du facteur de forme de chaîne de PSSNa est présentée dans le chapitre 3 de même qu'une mesure du facteur de forme de ces mêmes chaînes mais au sein même des complexes.

Chapitre 4

Structures des complexes et conformation des macromolécules : trois situations bien différentes

Dans ce premier chapitre de résultats nous souhaitons montrer que l'on peut clairement différencier 3 types de structures dans notre système. Nous utiliserons deux propriétés macroscopiques pour les différencier :

- d'une part l'aspect visuel (turbide ou limpide)
- d'autre part les propriétés mécaniques (gel ou liquide)

Pour chacune de ces propriétés nous verrons que les deux types d'échantillons correspondent à deux types de structures bien différentes observées par DNPA.

Nous donnerons dans chaque cas l'explication de la formation des structures observées. Elle mettra en relief, dans les deux cas, des informations clés obtenues par DNPA, soit sur la conformation de la protéine, soit sur la conformation des polyélectrolytes.

Préparation des échantillons expérimentaux

Tous les échantillons, que ce soit pour les diagrammes de phase ou les études DNPA ont toujours été préparés de la même manière. La méthode décrite ci-dessous s'applique donc pour les échantillons de ce chapitre et de ceux à venir sauf cas spéciaux qui seront mentionnés.

Différents polyélectrolytes ont tout d'abord été préparés via la méthode décrite en 2.1.3. En pratique, nous avons utilisé comme polymères parents des polystyrènes commerciaux (Polymer Standard Service) à faible polymolécularité ($M_n/M_w = 1.03$) et de masse comprise entre 4500 et 90000 Da (soit entre 40 et 800 monomères). Afin de pouvoir étudier ces polymères par diffusion neutronique, les sulfonations ont également été effectuées sur des po-

lystyrènes deutériés. De plus la neutralisation a également été effectuée avec de l'hydroxyde de tetraméthylammonium (TAM)OH afin d'avoir du polystyrène sulfonate avec le contre-ion TAM⁺.

Les échantillons ont ensuite toujours été préparés de la même manière. Tout d'abord est préparé le solvant qui servira aux échantillons. Ce solvant est préparé soit à partir d'eau pure pour les diagrammes de phase, soit à partir d'eau lourde ou d'un mélange eau légère-eau lourde pour les études DNPA. Afin de fixer le pH, il est nécessaire de choisir des tampons pH adéquats. Nous avons pour cela choisi plusieurs couples acide-base. Pour le pH 3 a été utilisé le couple acide chloroacétique - chloroacétate (CH_2ClCOOH - $\text{CH}_2\text{ClCOO}^-$), pour le pH 4.7 a été utilisé le couple acide acétique - acétate (CH_3COOH - CH_3COO^-), pour le pH 7 a été utilisé le couple phosphate monobasique - phosphate dibasique (H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}) et enfin pour le pH 10 a été utilisé le couple éthanolamine - éthanolammonium ($\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ - $\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$). Les contre-ions classiquement utilisés sont les ions sodium, cependant pour certaines expériences spécifiques, nous avons utilisé des contre ions tétraméthylammonium (TAM).

Avant d'effectuer le mélange sont ensuite préparées deux solutions de volume équivalent contenant une le lysozyme (Sigma-Aldrich) à une concentration double à celle voulue au final et une contenant le PSS également à concentration double à celle voulue. Le mélange est effectué en dispersant d'un coup la solution de PSS dans celle de protéine ou inversement et en agitant légèrement pour homogénéiser le mélange.

4.1 Echantillons turbides et limpides : deux structures distinctes

La première partie de cette étude concerne la première frontière visible dans nos échantillons : la frontière turbide-limpide.

4.1.1 Caractérisation visuelle

Nous décrirons dans cette partie les diagrammes d'état macroscopique qui ont été construits pour plusieurs cas, notamment en fonction de la taille des chaînes de PSS et du pH, et ce à une force ionique fixe de 50 mM. Ces diagrammes sont qualifiés "d'état" et non "de phase" car le système n'est pas à l'équilibre thermodynamique. En effet, le système atteint différents états finaux suivant son histoire comme ce sera observé tout au long de l'étude. Ces diagrammes d'état ont été construits en partie par Diane Ung et Amaury Frouin qui ont été

en stage dans notre laboratoire.

Dans cette partie ainsi que dans la suite de l'étude nous raisonnerons en concentrations mais également en rapport de charges introduites $[-]/[+]_{intro}$ correspondant au ratio de charge négatives apportées par le polyélectrolyte sur le nombre de charges positives apportées par la protéine. En pratique il dépend des concentrations molaires en chacun des composants et de leur charge (donc du pH pour la protéine et du taux de charge f pour le PSS). La concentration en PSS est celle des monomères pour être indépendante des tailles de chaîne.

$$[-]/[+]_{intro} = \frac{[PSS].f}{[lysozyme].z} \quad (4.1)$$

Avec f le taux de charge du PSS et z le nombres de charges par protéine à un pH donné.

Dans cette série de diagrammes d'état sont présentées les structures macroscopiques observées pour plusieurs tailles de chaînes de PSS et plusieurs pH. Les tailles de chaîne utilisées (pour les polystyrènes parents) correspondent à 40, 100 et 600 unités statistiques.

4.1.1.1 Evolution temporelle

Une première remarque importante est que tous les échantillons préparés sont turbides à $t = 0$ et ce quelle que soit la taille des chaînes, la concentration en chacun des composés ou le pH. Les échantillons composés de chaînes courtes sont blancs, opaques et liquides alors que ceux avec les chaînes longues sont moins opaques et en général gélifiés (certains pouvant cependant être liquides, nous reviendrons sur ce point).

Les échantillons évoluent ensuite sur une durée allant de quelques heures à quelques jours pour atteindre un état stable. Cette évolution est flagrante comme le montre l'exemple de la figure 4.1 dont les photographies ont été prises sur des échantillons de taille $N = 600$ monomères et à un pH de 3 à plusieurs temps après le mélange. On peut observer une nette évolution des échantillons proches de la frontière jusqu'à atteindre un régime d'équilibre. C'est à ce moment qu'apparaît une frontière nette entre deux domaines : un premier où les mélanges restent turbides et un second où ils sont devenus limpides. Cette frontière peut être plus ou moins large, pour certains échantillons il est possible d'observer une démixion avec une phase limpide surnageante et une phase turbide précipitée.

La photographie de la figure 4.2 montre ces différents états métastables pour deux tailles de chaîne, 100 et 600 monomères et pour un pH égal à 3.

Les échantillons n'évoluent plus à partir de 1 à 3 semaines ce qui constituera notre état de pseudo-équilibre. Pour les échantillons plus éloignés de la frontière, cet état est atteint en quelques heures.

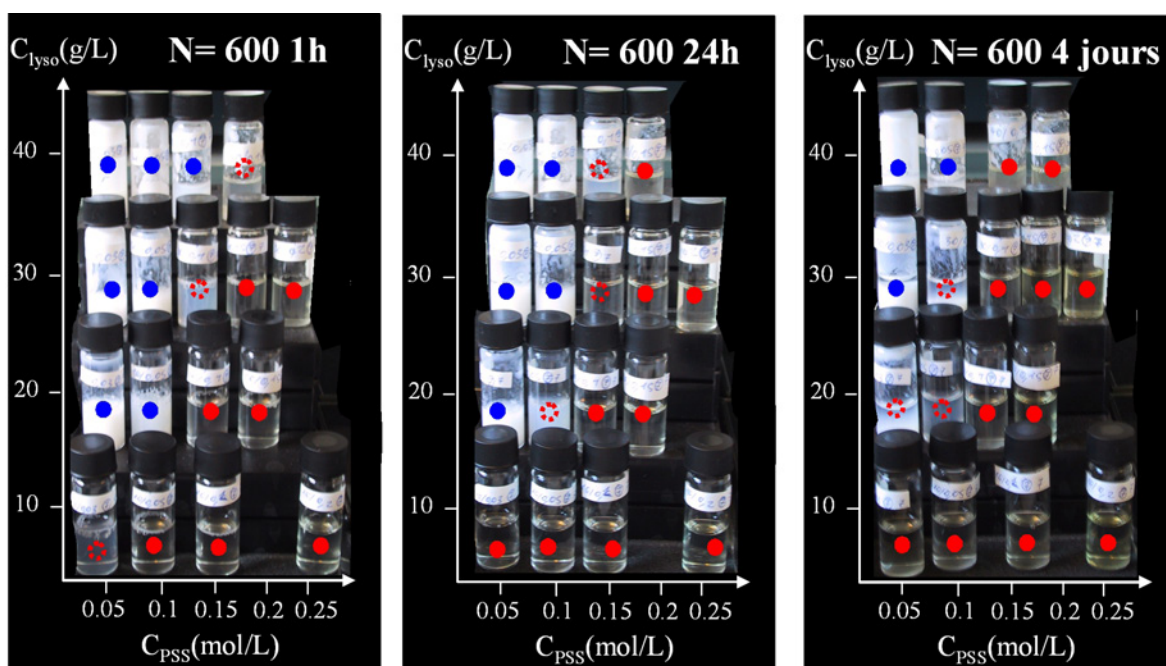


FIG. 4.1 – Evolution temporelle des échantillons à pH 3 pour des chaînes de 600 monomères. Un point bleu représente un échantillon turbide, un point rouge vide représente un échantillon biphasique et un point rouge plein représente un échantillon limpide.

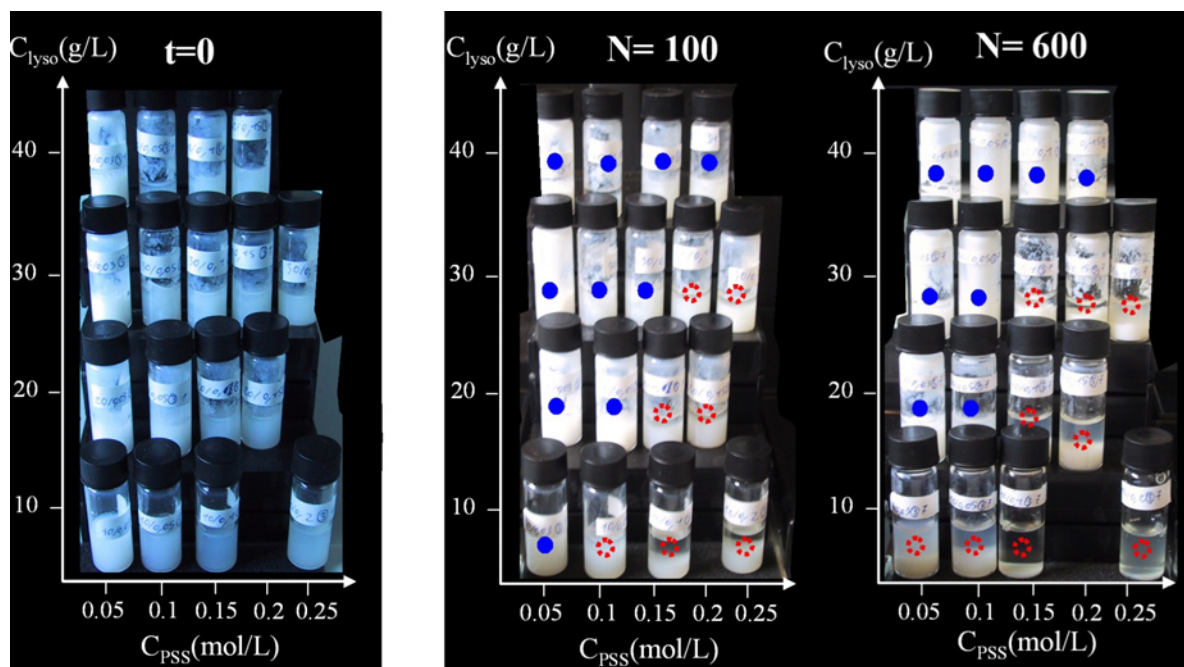


FIG. 4.2 – Diagrammes d'état à l'équilibre à pH 3 pour $N = 100$ monomères et $N = 600$ monomères. Un point bleu représente un échantillon turbide, un point rouge vide représente un échantillon biphasique et un point rouge plein représente un échantillon limpide.

4.1.1.2 Effet de la taille des chaînes

Observons maintenant plus en détail ces variations que nous avons reporté sur les diagrammes d'état des figures 4.3 à 4.5. Dans cette première série, nous considérons l'état stable en fonction des concentrations en protéine et polyélectrolyte, ainsi qu'en fonction des rapports de charge, cette dernière représentation étant plus pertinente lorsqu'on s'intéresse aux interactions électrostatiques.

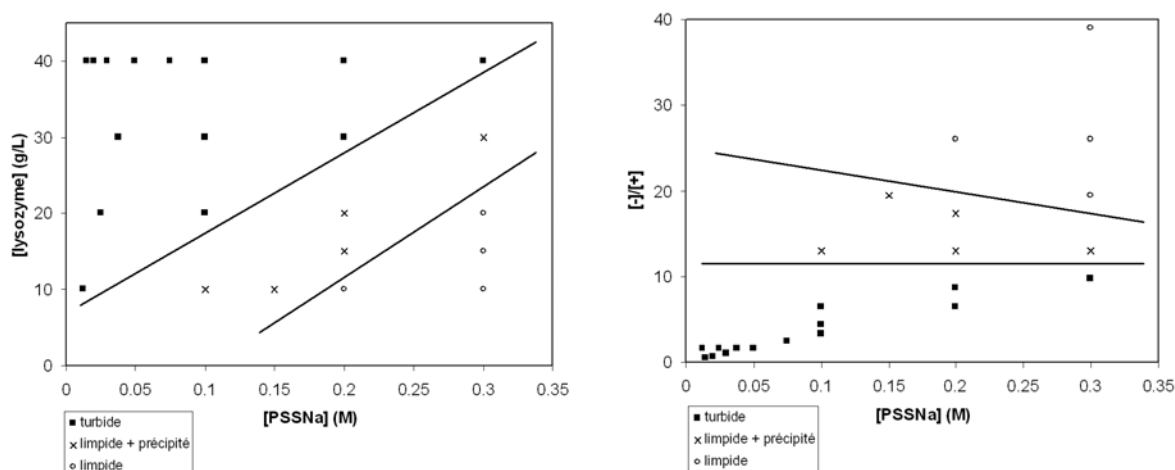


FIG. 4.3 – diagramme d'état pour $N = 40$ monomères. (a) : en fonction des concentrations des composés. (b) : en fonction du rapport de charge introduit.

Pour les chaînes de 40 monomères (diagramme 4.3), trois zones peuvent être distinguées. Une première où les échantillons ne varient pas avec le temps et restent turbides, une seconde où un surnageant limpide coexiste avec une phase turbide précipitée et enfin un dernier où l'échantillon est totalement limpide. La zone turbide correspond à un rapport de charge introduit inférieur à 10, la zone intermédiaire se situe entre 10 et 20 environ et enfin la zone limpide se situe au delà de 20.

Pour les échantillons avec les chaînes de 100 monomères ce sont cette fois deux zones qui peuvent être distinguées, une turbide et une limpide. La représentation en fonction du rapport de charge introduit montre une fois de plus que la frontière est directement dépendante de ce paramètre. Par contre on note un décalage par rapport aux chaînes de 40 monomères puisque la frontière se situe dans ce cas à un rapport de charge introduit de 5 environ. Il est donc nécessaire d'introduire moins de polyélectrolyte pour induire ce changement de structure.

La dernière série présentée est celle des échantillons contenant des polyélectrolytes de 600 unités. Dans cette dernière série la frontière entre les deux zones observées se situe aux alentours d'un rapport de charge introduit de 4, qui est proche de la valeur pour les chaînes de 100 unités.

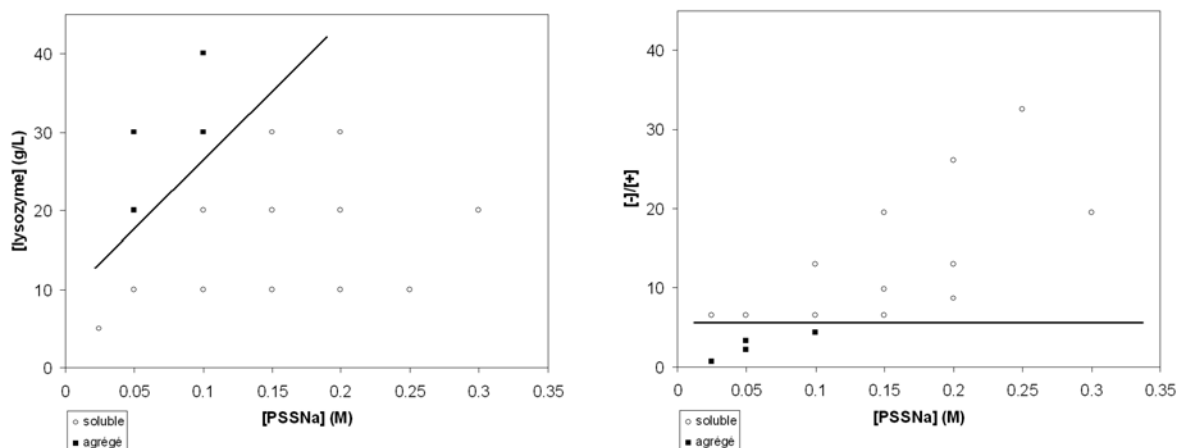


FIG. 4.4 – diagramme d'état pour $N = 100$ monomères. (a) : en fonction des concentrations des composés. (b) : en fonction du rapport de charge introduit.

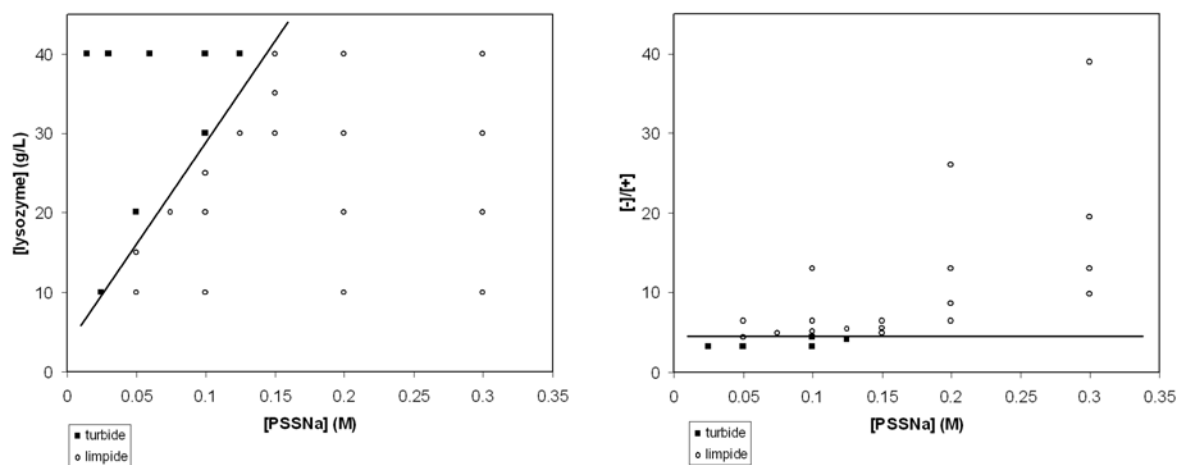


FIG. 4.5 – diagramme d'état pour $N = 600$ monomères. (a) : en fonction des concentrations des composés. (b) : en fonction du rapport de charge introduit.

Nous avons donc observé grâce à cette première série d'échantillons l'existence de deux zones distinctes dans le diagramme d'état, une zone turbide et une zone limpide. Ceci démontre l'existence de deux structures totalement différentes. Il faut également noter que le passage à l'état limpide est irréversible. En effet une fois devenu limpide, l'échantillon ne peut plus revenir à l'état turbide. Il faut également noter que cette frontière se déplace légèrement vers des rapports de charges introduits plus faibles lorsque les chaînes sont plus longues (voir figure 4.6).

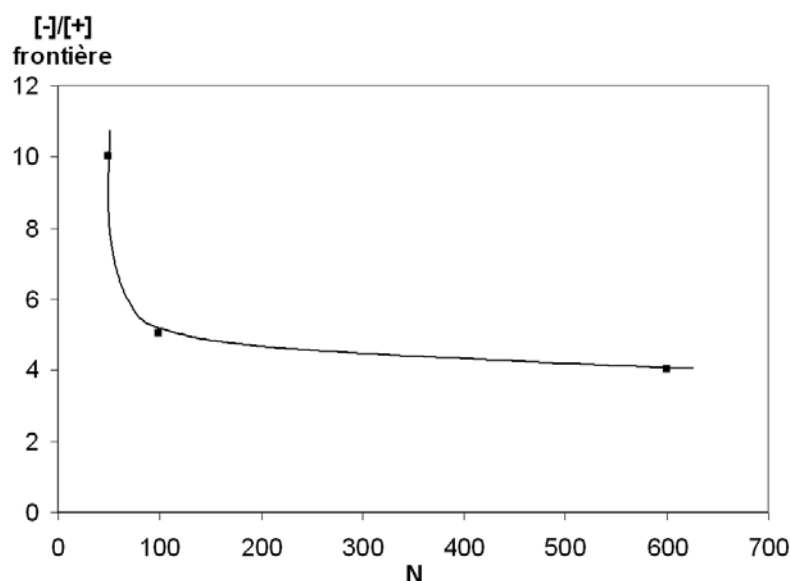


FIG. 4.6 – Frontière entre zone turbide et zone limpide en fonction de la taille des chaînes

4.1.1.3 Diagrammes en fonction du pH

Grâce à la première série de diagrammes d'état, nous avons pu montrer l'existence de deux zones distinctes dans nos échantillons, une turbide et une limpide et ce quelles que soient les tailles de polyélectrolyte utilisées. Un point crucial est que la frontière entre les deux zones, bien que légèrement différente suivant la taille des chaînes semble directement liée à un rapport de charge introduit dans le système. Afin de généraliser cette observation nous avons donc fait varier le pH du système.

Pour une taille de chaîne fixe de 600 unités nous faisons donc prendre au pH les valeurs 3, 4.7, 7 et 10. Ces différents pH permettent de varier la densité de charges sur la protéine, à savoir respectivement 17, 11, 8 et 4 charges par protéine. Nous avons construit nos différents diagrammes d'état en utilisant les mêmes concentrations de composés que dans les cas présentés précédemment. Les diagrammes des figures 4.8 à 4.11 montrent clairement que le

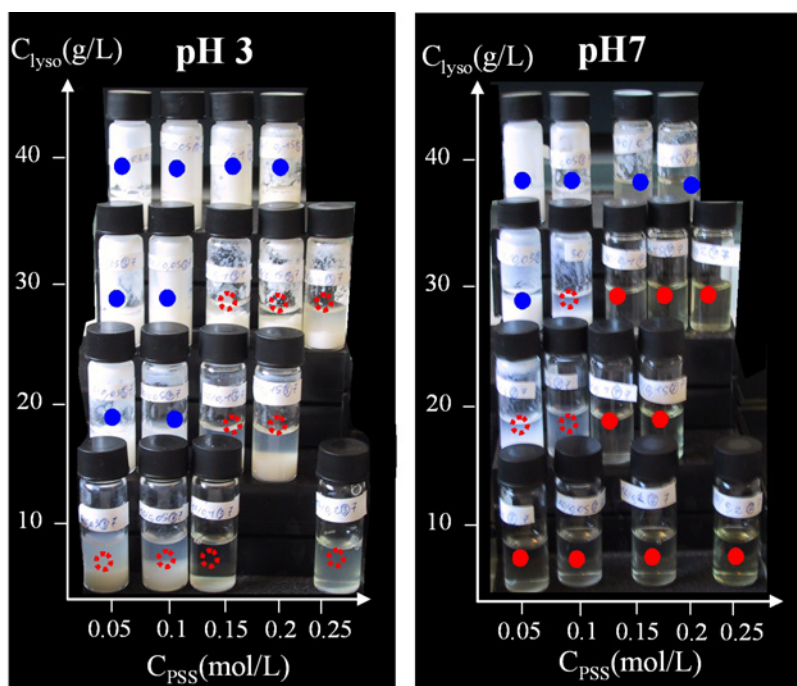


FIG. 4.7 – diagrammes d'état à pH 3 et pH 7 pour $N = 600$ monomères

frontière se déplace lorsque le pH varie. Pour exemple sont représentés les deux diagrammes à pH= 3 et pH= 7 en photographie sur la figure 4.7.

Cette variation de la frontière se fait vers des concentrations en polymère plus basses à mesure que le pH augmente. Le nombre de charges portées par la protéine baissant quand le pH augmente, cela tend donc à conserver un même rapport de charge. Nous avons donc représenté sur la figure 4.12 les quatre diagrammes d'état en fonction du rapport de charge introduit.

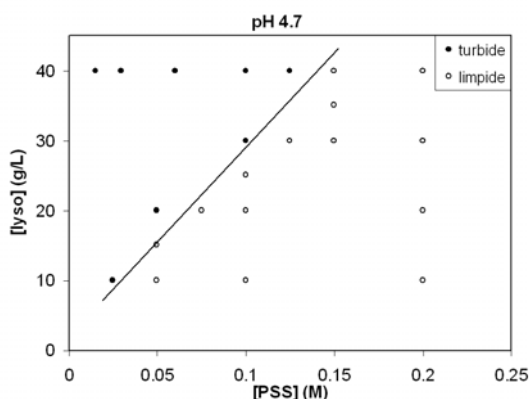
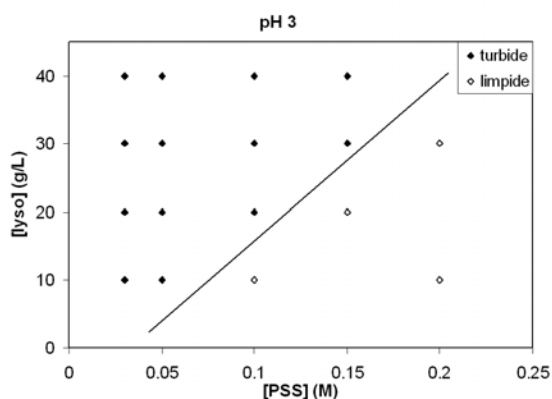


FIG. 4.8 – Diagramme d'état pour le pH 3

FIG. 4.9 – Diagramme d'état pour le pH 4.7

Cette figure montre de façon nette que la frontière entre les zones turbides et limpides

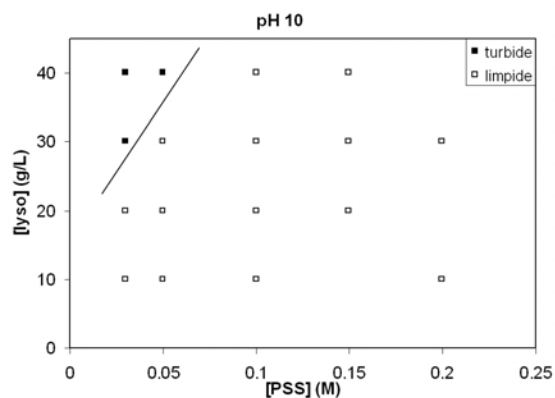
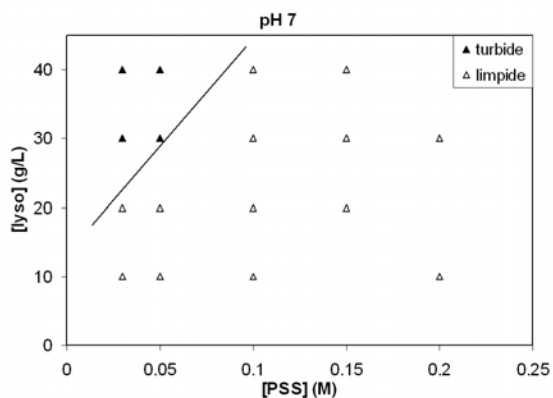


FIG. 4.10 – Diagramme d'état pour le pH 7 FIG. 4.11 – Diagramme d'état pour le pH 10

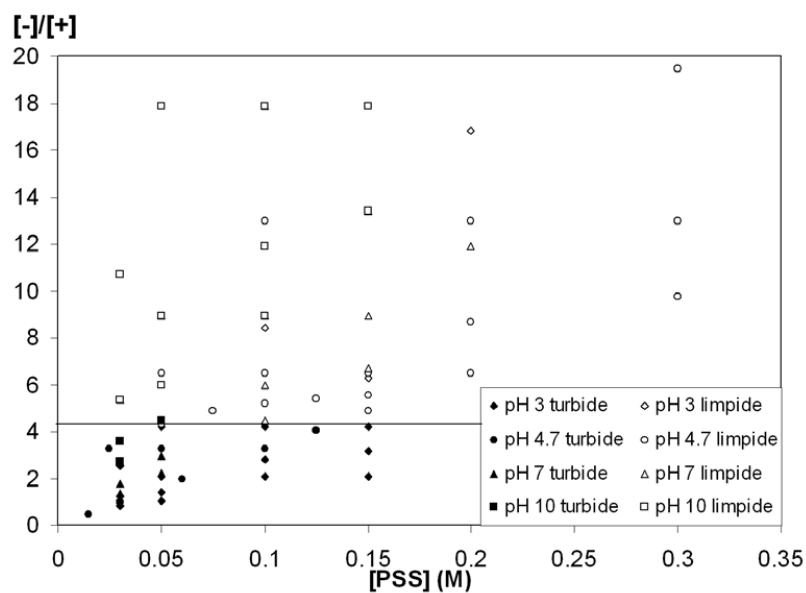


FIG. 4.12 – Diagrammes d'état pour les quatre pH en fonction du rapport de charge introduit

est uniquement fonction du rapport de charge introduit puisque les différentes frontières pour les quatre pH se superposent lorsqu'elles sont calculées en terme de rapport de charge. Ceci prouve donc qu'avant tout ce sont les interactions électrostatiques qui gouvernent la transition turbide-limpide dans le système.

4.1.1.4 Bilan

L'étude de ces différents diagrammes d'état a fait ressortir trois informations principales.

Tout d'abord que le système évolue en fonction du temps et est donc hors d'équilibre. On peut dire qu'il y a deux temps dans le système : un premier très rapide de formation de complexes (puisque les échantillons deviennent instantanément turbides quelles que soient les conditions) puis un second sur lequel le système évolue lentement. Nous avons donc considéré qu'au delà d'un temps allant de quelques heures à quelques jours suivant sa position sur le diagramme, un échantillon peut être considéré comme étant dans un état de quasi-équilibre.

Deuxièmement, deux états ont été clairement identifiés. Un premier turbide qui contient donc des objets de taille suffisante pour diffuser la lumière et un second limpide où ces objets initialement présents (pour rappel à $t = 0$ tous les échantillons sont turbides) ont disparu.

Enfin une troisième information est que les interactions électrostatiques jouent un rôle prépondérant dans ce changement de structure puisque la frontière entre les deux zones est, pour une taille donnée, à un rapport de charge introduit constant.

Nous avons donc étudié par diffusion de neutrons aux petits angles une gamme d'échantillons situés de part et d'autre de cette transition pour déterminer les structures formées.

4.1.2 Deux interactions différentes : caractérisation par DNPA

Nous allons dans cette partie décrire les structures obtenues pour différents rapports de charge introduits grâce à la diffusion de neutrons aux petits angles. Chaque échantillon a été mesuré dans deux solvants différents : 100% D₂O pour obtenir le signal de la protéine et 43% D₂O / 57% H₂O pour obtenir le signal du polyélectrolyte. Dans les deux cas un des composants est totalement masqué et ne donne aucun signal.

La concentration de lysozyme a été fixée à 40g/L pour tous les échantillons afin d'obtenir un fort signal. Pour faire varier le rapport de charge introduit c'est donc la concentration en PSS que nous avons variée entre 0.05M et 0.3M ce qui correspond à des rapports de charge compris entre 1.66 et 20. Pour cette étude, le nombre de monomères des chaînes de PSS a été fixé à $N = 40$ et le pH à 4.7. Pour plus de lisibilité, les courbes de diffusion de la figure 4.13 sont présentées séparées d'un facteur 10 pour éviter une superposition. Les courbes de signal mesuré de protéine sont comparées à un facteur de forme de protéine mesuré grâce à

du lysozyme seul en solution à 10 g/L (donc en régime dilué) et multiplié par 4 pour pouvoir être directement comparable. Dans le cas du signal du polyélectrolyte, la comparaison pour le rapport 3.33 est fait avec une solution de PSS pur mesurée à 0.1 M (concentration introduite pour obtenir le rapport 3.33), pour le rapport 13 la solution de PSS pur est mesurée à 0.2 M et pour le rapport 20 à 0.3 M.

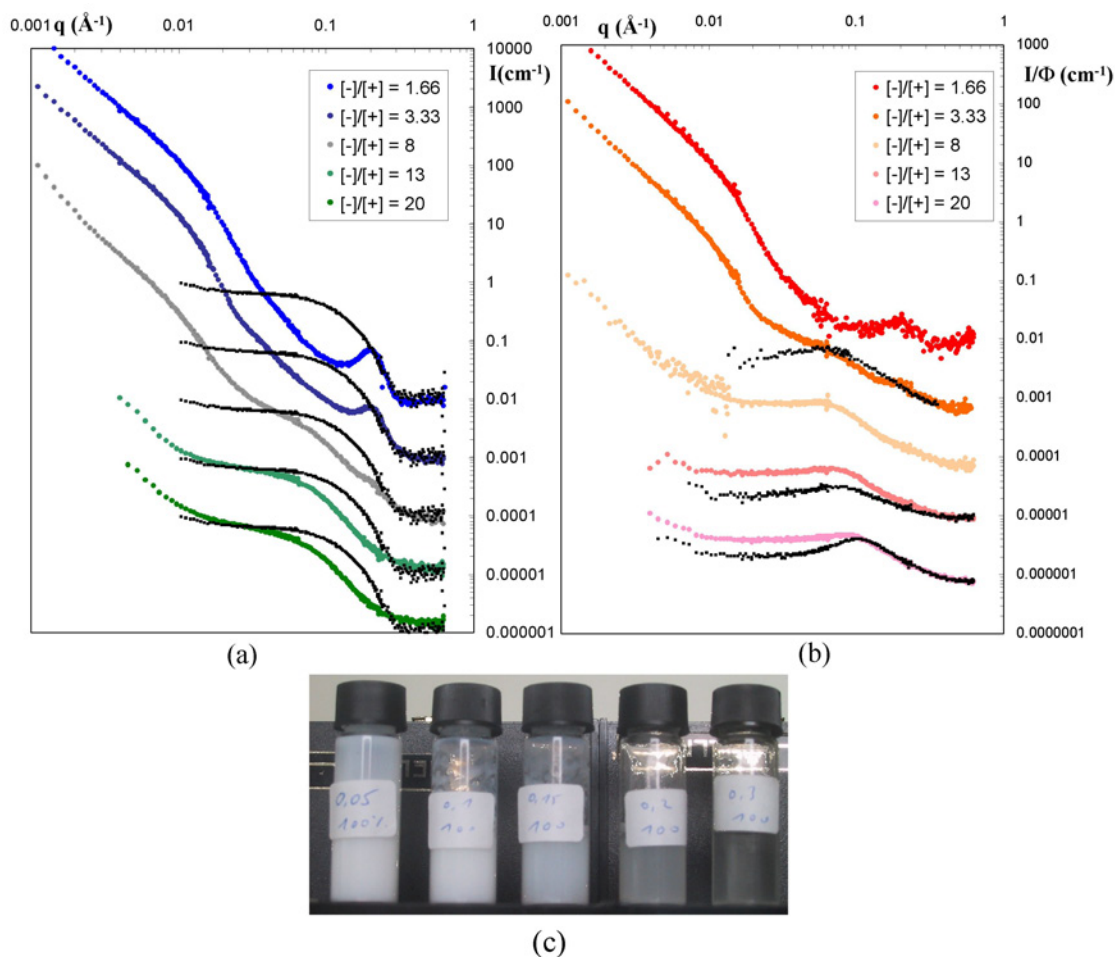


FIG. 4.13 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit. (a) : courbes de diffusion de la protéine pour les cinq rapports de charge décalées d'un facteur 10. Les courbes sont comparées à un facteur de forme de protéine diluée (10 g/L), mesuré dans les mêmes conditions de contraste, et multiplié par un facteur 4 (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les cinq rapports de charge séparées d'un facteur 10. (c) : photographie de l'aspect macroscopique des échantillons.

Les rapports de charges 1.66 et 3.33 se situent dans la partie turbide du diagramme d'état et les rapports 13 et 20 dans la partie limpide (voir figure 4.13). L'échantillon de rapport de charge 8 est situé près de la limite de clarification comme le montre la photographie de la figure 4.13(c). Une première observation rapide des courbes de diffusion de neutron permet

également de voir que les courbes sont radicalement différentes de part et d'autre de cette frontière avec un cas intermédiaire près de la limite de clarification. Nous allons maintenant détailler les résultats obtenus pour cette série d'échantillons de chaque côté de cette frontière pour chacun des contrastes.

4.1.2.1 Rapports de charge inférieurs à 5

Sur la figure 4.13, les courbes correspondant aux rapports de charge introduit 1.66 et 3.33 sont très similaires, et ce tant pour le signal de la protéine que pour celui du polyélectrolyte.

On voit d'abord que la diffusion aux petits q est très importante pour les deux contrastes. Le système contient donc des objets qui diffusent énormément aux petits vecteurs d'onde (jusqu'à 10000 cm^{-1}), soit de gros objets (plus de 1000 Å), denses et faits de protéine et de polyélectrolyte ce qui est cohérent avec la turbidité observée dans les échantillons.

Pour le signal de protéine, on observe aux grands vecteurs d'onde que la forme de la protéine est préservée puisque le signal suit celui de protéine seule en solution (représenté en noir sur la figure). Il apparaît ensuite un pic de corrélation à 0.2 Å^{-1} suivi d'une large diffusion jusqu'aux plus petits vecteurs d'onde. Nous reviendrons plus en détail en 4.2 sur la signification de ces spectres de diffusion.

Pour le signal du polyélectrolyte, on observe une disparition du pic polyélectrolyte présent initialement en solution (représenté en noir sur la figure 4.13), et l'apparition d'une large diffusion jusqu'aux plus petits vecteurs d'onde similaire à celle du contraste protéine. Seule la diffusion en q^{-1} à grands vecteurs d'onde est toujours présente.

4.1.2.2 Rapports supérieurs à 10

Pour les rapports de charge introduits 13 et 20, les courbes de diffusion obtenues sont également très similaires entre elles mais diffèrent beaucoup de celles que nous venons de décrire.

La faible intensité du signal de diffusion à petits vecteurs d'onde de diffusion pour les deux signaux montre qu'il n'y a plus de gros objets en solution, en accord avec la limpidité des échantillons.

Dans le solvant 100 % D_2O (polyélectrolyte éteint), le signal de la protéine à grands vecteurs d'onde ne suit plus celui de la protéine seule en régime dilué, ce qui signifie que le facteur de forme de la protéine a changé. Nous reviendrons plus en détail sur ce phénomène en 4.1.3 ainsi que dans le chapitre 7. Il faut ici noter également la perte de diffusion à petits vecteurs d'onde. Cette diffusion est diminuée d'un facteur autour de 1000. On a donc perte des gros objets présents pour les rapports de charge inférieurs à 5.

Dans le solvant 43% D₂O / 57% H₂O (protéine éteinte), le signal du polyélectrolyte change quant à lui aussi radicalement comparé aux rapports introduits inférieurs à 5. On peut observer que le PSS retrouve sa conformation originelle en régime semi-dilué avec un pic de corrélation (légèrement décalé vers les petits vecteurs d'onde). Ici également la diffusion à petits vecteurs d'onde est diminuée d'un facteur environ égal à 1000.

4.1.2.3 Rapport intermédiaire

Le rapport de charge introduit égal à 8 correspond à la frontière turbide-limpide, comme visible en photographie (figure 4.13 (c)) et sur les diagrammes de phase (paragraphe 4.1.1). Le comportement en DNPA est également intermédiaire.

En effet la courbe du signal de protéine montre à grand vecteurs d'onde une pente intermédiaire entre celle des rapports introduits inférieurs à 5 et ceux supérieurs à 10. Le pic observé à 0.2 Å est toujours présent mais très atténué. De plus si l'échantillon diffuse toujours à petits vecteurs d'onde, il le fait de façon moins importante (environ 10 fois moins). Le signal paraît donc être un intermédiaire entre les deux signaux situés de part et d'autre de la frontière.

Cette remarque est également valable pour le signal du polyélectrolyte mais à un degré moindre. En effet dans ce contraste le signal est plutôt proche de celui observé pour des rapports de charge introduits supérieurs à 10, à savoir la présence d'un pic polyélectrolyte, mais néanmoins une diffusion aux petits vecteurs d'onde est toujours présente.

4.1.2.4 Bilan

Il est possible de dire après cette première série de mesures que les deux aspects visuels turbides (pour des rapports de charge introduits inférieurs à 5) et limpides (pour des rapports supérieurs à 10) correspondent à deux structures distinctes présentes dans nos échantillons. La frontière paraît quant à elle être un état intermédiaire entre les deux où les deux structures coexistent.

Nous avons donc choisi pour la suite de l'étude des rapports de charge situés loin de cette frontière, avec un rapport de charge maximal de 3.33 pour la zone turbide et 20 pour la zone limpide afin de ne pas avoir à attendre trop longtemps que l'état de quasi-équilibre soit atteint.

4.1.3 Zone limpide : Une dénaturation inédite

Sur la figure 4.14 sont représentées les courbes de quatre échantillons contenant des polyélectrolytes à longueur de chaîne allant de 40 à 630 monomères pour un rapport de

charge introduit de 20. Chacun de ces échantillons a été mesuré dans les deux solvants, 100%D₂O pour le contraste protéine et 43%D₂O/57%H₂O pour le contraste polyélectrolyte.

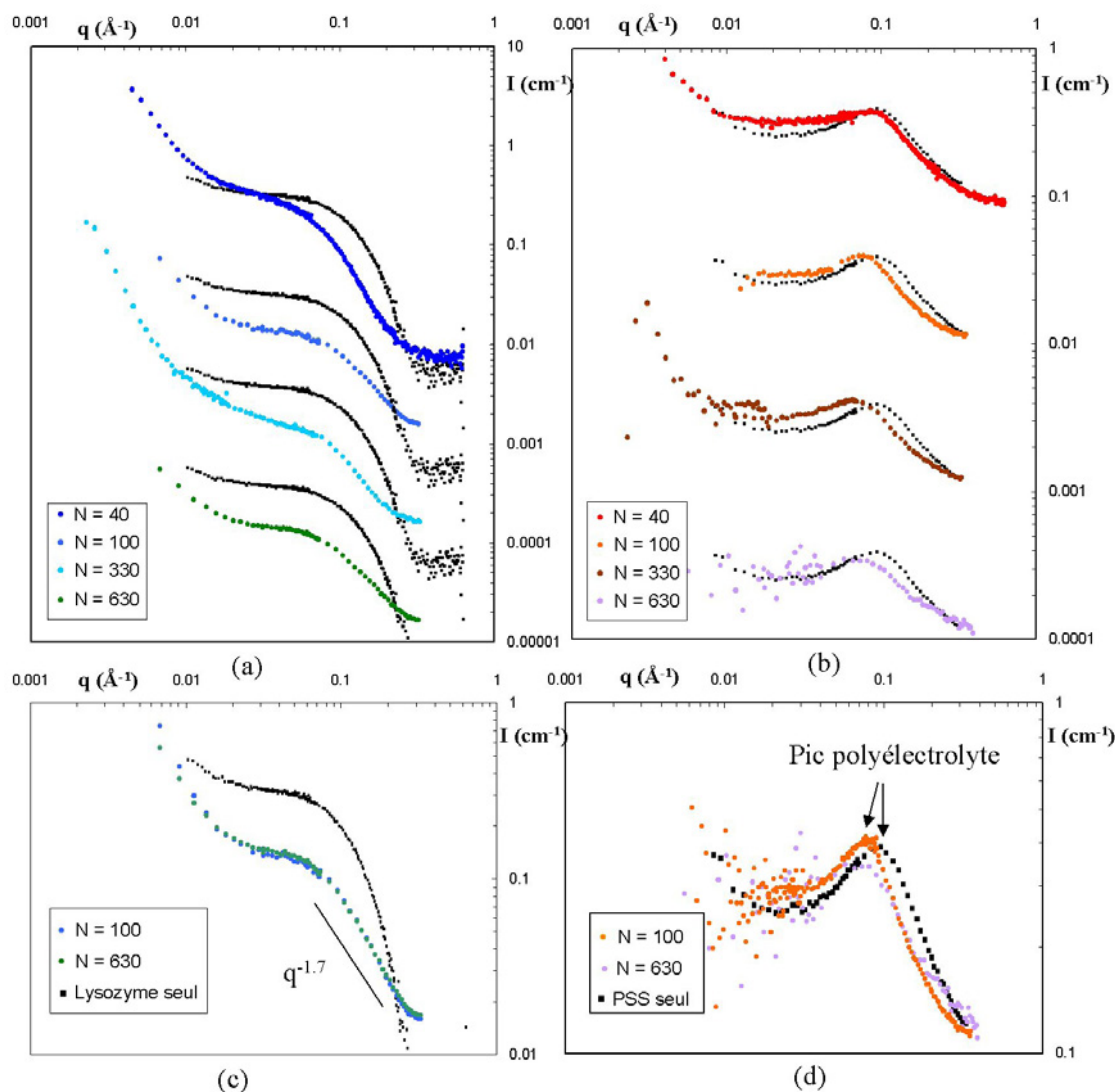


FIG. 4.14 – Courbes DNPA en fonction de la taille des chaînes PSS pour un rapport de charge introduit de 20. (a) : courbes de diffusion de la protéine décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte décalées d'un facteur 10. (c) : courbes de protéine pour $N=100$ et 630 monomères et caractéristiques principales. (d) : courbes de polyélectrolyte pour $N=100$ et 630 monomères et caractéristiques principales.

Une première observation est que la taille des chaînes de polyélectrolyte utilisées n'influe pas sur la structure finale obtenue quel que soit le contraste. Nous allons donc détailler les spectres obtenus pour chacun des contrastes afin de déterminer cette structure.

Le signal de la protéine dans le complexe est celui qui apporte le plus d'informations. Il

est ici comparé au facteur de forme du lysozyme mesuré à 10 g/L et multiplié par 2 pour être comparé à ces échantillons contenant 20g/L de protéine. Sur la partie (c) de la figure 4.14, il est possible de voir que le spectre de diffusion de la protéine change radicalement. La diffusion aux grands q passe de q^{-4} à $q^{-1.7}$. Cet exposant de diffusion correspond à un élément diffuseur de type chaîne à volume exclu. Cet exposant a déjà été mesuré dans la littérature sur des solutions de lysozyme dénaturé^{66,67}. Cela signifie donc que la protéine s'est dépliée sous l'action du polyélectrolyte et a donc perdu sa forme globulaire native. Entre $q = 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ et $q = 0.07 \text{ \AA}^{-1}$ il est ensuite possible d'observer un plateau, puis à de plus petites valeurs de vecteur d'onde on observe une légère diffusion. Elle pourrait être due au fait que les complexes ne sont pas totalement détruits au moment de la mesure mais dans ce cas la solution ne serait pas limpide. Il s'agit donc sûrement d'inhomogénéités à grandes échelles dans la solution.

Le changement de structure est assez drastique puisque le dépliement de la protéine aboutit à une structure unique du point de vue de la protéine, quelle que soit la longueur des chaînes utilisées.

De même que pour le signal de protéine, les différents spectres de polyélectrolyte pour les différentes tailles de chaînes sont tous semblables. Ils sont très proches de celui du PSS seul en solution à 0.3 M. Tous d'abord ils conservent la diffusion en q^{-1} typique des polyélectrolytes. De plus on peut observer un pic de corrélation qui prouve l'existence d'un réseau polyélectrolyte en régime semi-dilué. Ce pic est cependant décalé vers les petits vecteurs d'onde, la position du pic passant de $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ à $q = 0.075 \text{ \AA}^{-1}$. Cela démontre donc une contraction du réseau polyélectrolyte d'un facteur 1.33 environ. Il faut également noter que cette valeur de pic de corrélation est sensiblement la même que celle de l'épaulement dans le contraste protéine.

On peut dire au final que la structure formée est un réseau mixte de chaînes en solution, les chaînes de polyélectrolyte et les chaînes de protéine dépliée. Le fait que le pic de corrélation observé pour le PSS corresponde à la même valeur de vecteur d'onde que l'épaulement du signal de protéine permet de dire que les deux objets partagent une structure commune. Il doit donc y avoir au final une interaction légère entre les objets qui explique la contraction locale des chaînes de PSS. En effet la perte de la forme globulaire empêche désormais les chaînes de s'enrouler autour de la protéine. Cependant le fait que les deux objets ne possèdent pas la même structure à petite échelle (chaîne à volume exclu pour la protéine contre bâton

[66] Russo, D.; Durand, D.; Desmadril, M.; Calmettes, P. *Physica B* **2000**, 276-278, 520-521.

[67] Calmettes, P.; Durand, D.; Desmadril, M.; Minard, P.; Receveur, V.; Smith, J. *Biophys. Chem.* **1994**, 53, 105-113.

pour le PSS) prouve que leur interaction ne peut avoir lieu que partiellement et que les chaînes ne peuvent se décorer l'une l'autre. De plus cette interaction légère explique l'état liquide des échantillons. La chaîne dépliée étant plus petite que la taille du réseau elle ne peut pas interagir avec plusieurs chaînes de PSS. La figure 4.15 donne une représentation schématique de la structure obtenue. Le même type de comportement a déjà été observé sur des mélanges de polyélectrolyte et de gélatine, qui est très proche de la protéine dénaturée par Hone et Cosgrove⁶⁸. La seule différence entre leurs spectres et nos résultats concerne la petite remontée que nous observons aux petits angles qui n'existe pas avec la gélatine. Ceci peut être dû à quelques restes d'agrégats de protéines dans le réseau, provenant d'éventuels effets de déplétion. Cette légère agrégation demeure néanmoins suffisamment limitée pour empêcher que les échantillons diffusent la lumière.

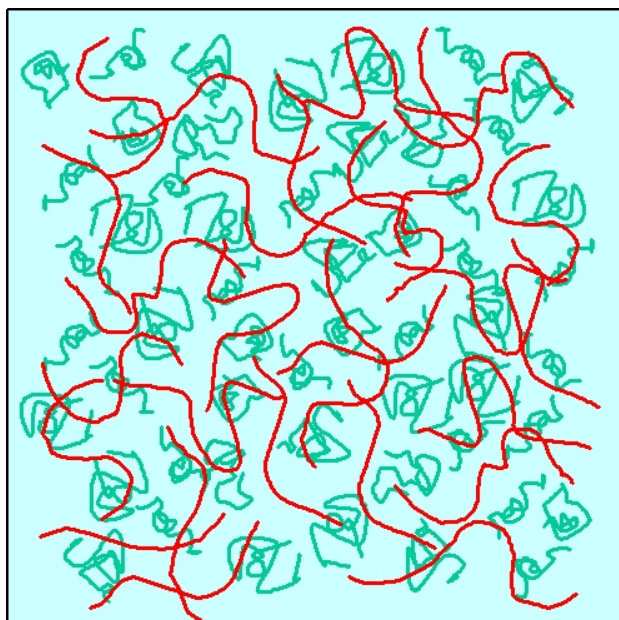


FIG. 4.15 – Représentation schématique de la structure pour un rapport de charge introduit de 20. Les chaînes de polyélectrolyte sont représentées en rouge et les protéines dénaturées en vert.

Cet effet de dénaturation est un effet inédit à notre meilleure connaissance pour un système polyélectrolyte-protéine bien qu'il ait souvent été vu dans des systèmes protéine-surfactant⁶⁹. De plus, récemment Ivinova et al. ont observé lors d'une étude calorimétrique⁷⁰ sur des complexes polyélectrolyte-protéine que le PSS était le seul polyélectrolyte qui dénaturait la protéine à température ambiante avec des rapports de charge introduits bien au

[68] Hone, J.; Howe, A.; Cosgrove, T. *Macromolecules* **2000**, 33, 1206-1212.

[69] Stenstam, A.; Khan, A.; Wennerström, H. *Langmuir* **2001**, 17, 7513-7520.

[70] Ivinova, O.; Izumrudov, V.; Muronetz, V.; Galaev, I.; Mattiasson, B. *Macromolecular bioscience* **2003**, 3-4, 210-215.

delà des frontières que nous avons observé. Nous reviendrons plus en détail sur ce phénomène et notamment sur les conditions de dénaturation dans le chapitre 8.

4.2 Echantillons turbides : du réseau réticulé aux globules denses

4.2.1 Deux comportements rhéologiques distincts

Il est nécessaire d'observer plus en détails la région turbide du diagramme. En effet, elle contient une particularité supplémentaire qui différencie les chaînes longues et les chaînes courtes du point de vue de leur comportement macroscopique. On notera ici que les échantillons sont hors d'équilibre et que cela rend leur caractérisation rhéologique impossible. En effet des tentatives ont été effectuées au laboratoire Matière et Systèmes Complexes - Université Paris 7 avec Sandra Lerouge sur un rhéomètre à cône plan ainsi que de géométrie Couette. Il s'est avéré que le système évolue vers un état différent et ne revient pas à son état initial après contrainte. Les mesures étaient donc constamment non reproductibles. C'est pourquoi nous décrivons ici l'état macroscopique des échantillons comme simplement gelifiés ou liquides.

Le zoom de cette partie est représenté sur la figure 4.16. Les échantillons considérés ici sont à une concentration en protéine fixée à 40 g/L. Pour les chaînes longues et pour une concentration introduite en polyélectrolyte inférieure à 0.06 M, les échantillons passent de l'état turbide gel peu opaque à un état turbide liquide thixotrope puis en dessous de 0.03 M ils passent à un état liquide similaire à celui des échantillons faits avec des chaînes courtes.

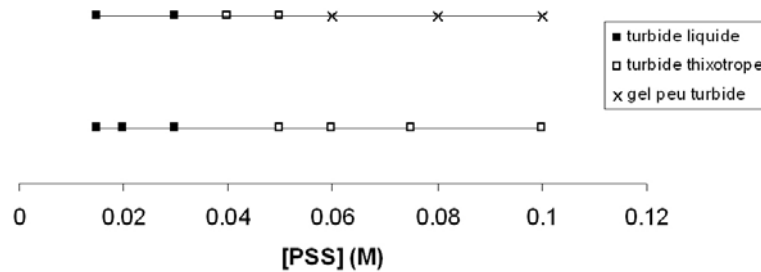


FIG. 4.16 – Zoom sur la partie turbide pour $N = 40$ monomères (ligne du haut) et $N = 600$ monomères (ligne du bas) à concentration fixe en protéine de 40 g/L

Une explication que nous pouvons donner à ce moment de l'étude est l'état de dilution

des chaînes de PSS. Il est possible de définir une concentration critique c^* frontière entre le régime dilué et le régime semi-dilué. Ce régime se définit par une interpénétration des chaînes aboutissant à un réseau transitoire de taille de maille ξ . Le calcul de c^* se fait de la façon suivante :

On calcule tout d'abord le rayon de giration du polyélectrolyte :

$$R_g = \sqrt{2Ll_p} \quad (4.2)$$

Avec L la longueur d'une chaîne étirée et l_p sa longueur de persistance.

La fraction volumique occupée par les chaînes est donc :

$$\phi = R_g^3 \times \frac{c \mathcal{N}_a}{N} \quad (4.3)$$

Avec $\frac{c \mathcal{N}_a}{N}$ représentant la concentration en chaînes, N étant le nombre de monomères par chaîne, \mathcal{N}_a le nombre d'avogadro et c la concentration en monomères. Ainsi le passage du régime dilué au régime semi-dilué se caractérisant par une interpénétration des chaînes, la concentration critique sera atteinte lorsque la fraction volumique ϕ sera égale à 1. Ce qui permet de redéfinir une concentration critique c^* :

$$c^* = \frac{N}{R_g^3 \mathcal{N}_a} \quad (4.4)$$

Cette concentration critique dépend donc essentiellement de la longueur de persistance et de la taille des chaînes. La longueur de persistance étant normalement la même pour les chaînes de PSS, c'est la taille des chaînes qui va jouer un rôle critique. On peut donc en déduire que pour les chaînes courtes, le système de départ est en régime dilué pour une concentration c^* inférieure à 0.09 M. Cette valeur vient de la longueur des chaînes et de la longueur de persistance qui est d'environ 50 Å pour cette salinité et cette concentration en PSS, d'après les résultats de la littérature⁷¹ (50 Å pour 34 mM et [PSS]= 0.1 Mol/L alors que nous sommes à 50 mM). Dans le cas des chaînes longues, cette valeur de concentration critique c^* passe à 0.02 M environ. Comme il est possible de l'observer sur la courbe 4.16 ce passage de régime semi-dilué à régime dilué correspond au passage de gel peu turbide à liquide turbide. Cela donnerait donc une première explication sur les structures macroscopiques obtenues à savoir qu'en partant d'une solution de polyélectrolyte en régime dilué on aboutit à des échantillons turbides liquides et qu'en partant d'une solution de polyélectrolyte en régime semi-dilué on aboutit à des échantillons gelés et peu turbides.

[71] Spiteri, M.; Boué, F.; Lapp, A.; Cotton, J. *Physical review letters* **1996**, 77, 5218-5220.

Cependant, cela n'explique pas pourquoi les échantillons à 0.04 M et 0.045 M pour les chaînes longues sont turbides thixotrope comme les échantillons avec les chaînes courtes. De plus, les échantillons réalisés avec les chaînes courtes pour des concentrations en chaînes de 0.06 M, 0.08 M et 0.1 M sont similaires, alors que la transition pour cette taille de chaîne est de 0.09 M. Ces résultats suggèrent qu'une éventuelle transition entre les régimes dilué et semi-dilué serait décalée vers les hautes concentrations en présence des protéines, et que donc la longueur de persistance des chaînes est modifiée par la présence des protéines. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre 4.2.3.3.

4.2.2 Deux assemblages distincts : caractérisation par DNPA

Dans la figure 4.2.2 sont présentées les courbes pour un rapport de charge égal à 3.33 (avec des concentrations de 40 g/L de lysozyme et de 0.1 mol/L de PSS) et ce pour 5 tailles de chaîne de PSS différentes, à savoir $N = 40, 100, 330, 630$ et 800 monomères. Les concentrations ont été choisies afin d'obtenir une bonne statistique lors des expériences de diffusion. Pour cette concentration en polymère, les chaînes sont en régime semi-dilué quelle que soit la longueur de chaîne. Chacun de ces rapports de charge a été mesuré dans les deux solvants, 100%D₂O pour le contraste protéine et 43%D₂O/57%H₂O pour le contraste polyélectrolyte.

Une première observation des courbes permet de distinguer deux cas limites :

- le cas des tailles de chaîne de 630 et 800 monomères qui correspond au cas des gels macroscopiques.
- le cas des tailles de chaîne de 40 et 100 monomères qui correspond au cas des échantillons liquides.

Nous allons détailler les structures formées dans ces deux cas.

4.2.2.1 Echantillons gelés : Gels réticulés par les protéines

Ce premier cas correspond aux chaînes de PSS longues, donc de 630 et 800 monomères.

Une observation du signal de la protéine montre que jusqu'à un vecteur d'onde de 0.03 \AA^{-1} il reste équivalent à celui de la protéine seule en régime dilué, à savoir une diffusion en q^{-4} à grands vecteurs d'onde due à la forme globulaire de la protéine puis un plateau qui se superpose exactement avec le signal de la protéine en régime dilué jusqu'à 0.03 \AA^{-1} ($\approx 200 \text{ \AA}$ dans l'espace direct). Sur des échelles locales, les protéines au sein des complexes se comportent donc comme un système de protéines sans interactions et sont réparties aléatoirement dans l'espace.

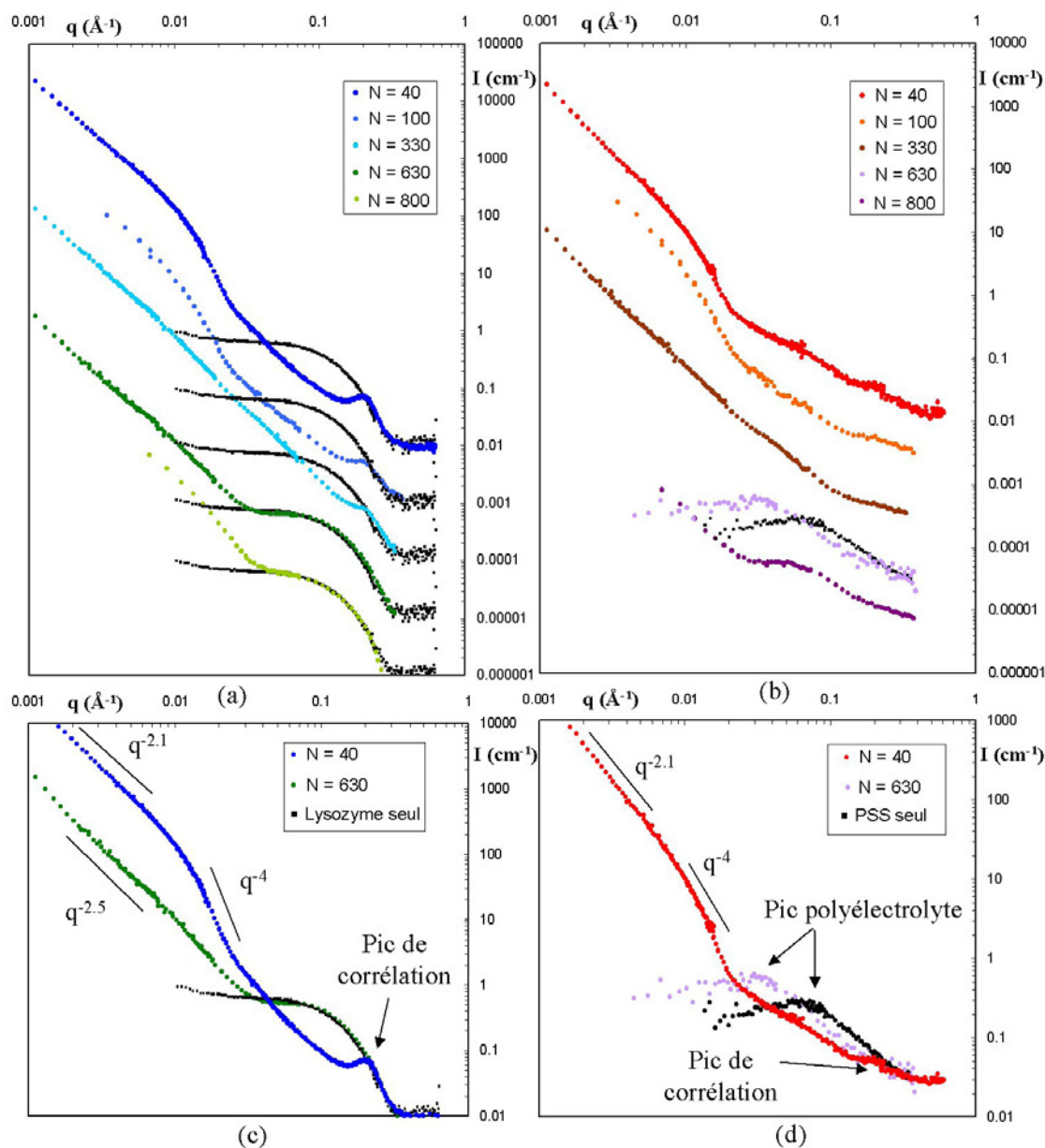


FIG. 4.17 – Courbes DNPA en fonction de la taille des chaînes PSS pour un rapport de charge introduit de 3.33. (a) : courbes de diffusion de la protéine pour cinq tailles de chaîne décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour cinq tailles de chaîne séparées d'un facteur 10. (c) : courbes de protéine pour $N = 40$ et 630 monomères et caractéristiques principales. (d) : courbes de polyélectrolyte pour $N = 40$ et 630 monomères et caractéristiques principales.

Par contre pour des vecteurs d'onde inférieurs à 0.03 \AA^{-1} apparaît une diffusion constante jusqu'aux plus petites valeurs de vecteur d'onde sondées. Ceci dénote des hétérogénéités de distribution à des échelles supérieures à 200 \AA dans l'espace réel. Afin de mesurer précisément l'exposant de cette diffusion, nous avons calculé le facteur de structure de la protéine dans le complexe. En effet la diffusion de la protéine peut être écrite comme suit :

$$I_{lyso}(q) = \Phi_{lyso} \Delta\rho_{lyso}^2 V_{lyso} P_{lyso}(q) S_{lyso}(q) \quad (4.5)$$

Où Φ_{lyso} est la fraction volumique de lysozyme, $\Delta\rho_{lyso}^2$ le contraste du lysozyme par rapport au solvant en cm^{-4} , V le volume d'une protéine en cm^3 , $P_{lyso}(q)$ le facteur de forme du lysozyme et $S_{lyso}(q)$ le facteur de structure du lysozyme. Pour obtenir le facteur de structure, il suffit de diviser le signal total par le facteur de forme mesuré à 10 g/L et multiplié par 4. Ce facteur de forme tient donc compte des préfacteurs de contraste, de fraction volumique et de volume. Le facteur de structure obtenu est représenté dans la figure 4.18.

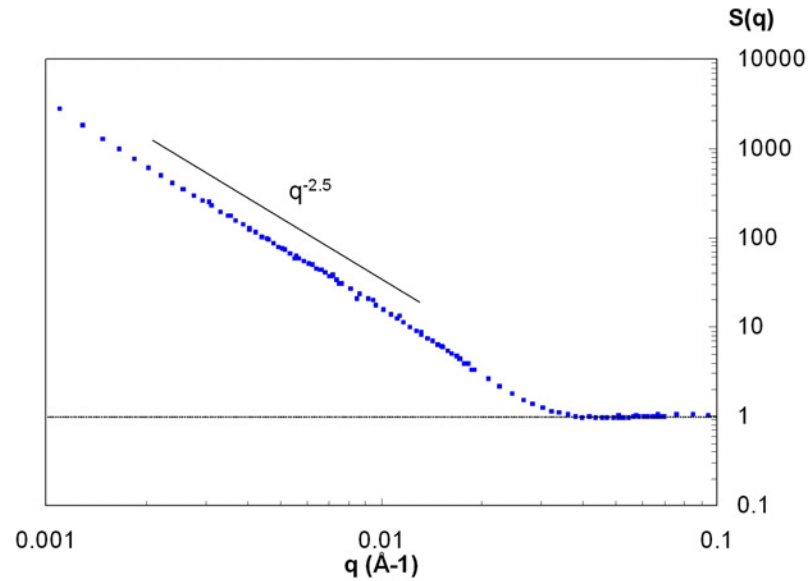


FIG. 4.18 – Facteur de structure pour les chaînes longues

Le facteur de forme tenant compte des préfacteurs, le facteur de structure tend vers 1 à grands vecteurs d'onde. Une fois la valeur de 0.03 \AA^{-1} dépassée vers les petits vecteurs d'onde, il décroît de manière constante en $q^{-2.5}$. Cette valeur indique que les protéines au delà d'une échelle de 200 \AA dans l'espace réel sont organisées de façon fractale avec un exposant fractal égal à 2.5. Ces inhomogénéités à grande échelle sont responsables de l'aspect turbide des échantillons du fait de la diffusion de la lumière.

La mesure des mêmes échantillons dans le contraste éteignant la protéine permet d'avoir une idée plus claire de la structure formée. En effet on peut observer que le signal du polyélectrolyte seul est conservé, à savoir un pic de corrélation correspondant à un régime semi-dilué après une diffusion en q^{-1} dénotant le caractère bâton du polyélectrolyte et pas de diffusion aux petits vecteurs d'onde. Il faut noter que ce pic est décalé alors que la concentration en polyélectrolyte ne change pas. Cela signifie donc que le polyélectrolyte se contracte localement du fait de son interaction avec la protéine et donc que la distance inter-chaînes augmente induisant un pic de corrélation à un vecteur d'onde plus petit, synonyme d'une distance plus grande dans l'espace réel. Une telle contraction de chaînes a déjà été observée dans le cas d'interactions avec des ions multivalents induisant des pontages⁷². Ce pic est déplacé de 0.05 \AA^{-1} à 0.03 \AA^{-1} . Cela correspond dans l'espace réel à une taille de réseau qui passe de 90 \AA à 200 \AA soit une augmentation d'un facteur supérieur à 2. Il faut noter que cette valeur correspond donc à la valeur à laquelle la protéine commence à avoir des hétérogénéités de distribution.

Finalement il est possible de dire que les protéines n'ont aucune interaction à une échelle inférieure à la taille du réseau polyélectrolyte mais présentent des inhomogénéités de distribution à des échelles supérieures. De plus les chaînes de PSS sont réparties de façon homogène dans tout le gel avec une organisation telle qu'elles forment un réseau typique de régime semi-dilué. On peut donc conclure que les chaînes de polyélectrolyte forment le squelette du gel qui est réticulé par les protéines réparties de façon hétérogène. De plus on peut également déduire que ces protéines sont collées aux chaînes. En effet le fait que la taille du réseau polyélectrolyte augmente et le fait que nous observions un gel macroscopique indique qu'il y a contact entre les deux entités. Ces contacts n'ont lieu qu'à certains points de la chaîne ce qui laisse des charges libres pour continuer à exercer une répulsion, sans quoi le réseau ne serait plus observé et le système s'effondrerait sur lui-même. La figure 4.19 donne une représentation schématique de la structure obtenue. De plus puisque nous avons vu que les hétérogénéités de distribution de la protéine apparaissent à une échelle supérieure à la taille du réseau, cela signifie que le nombre de protéines dans une maille est très variable d'une maille à l'autre. En prenant une description manichéenne on peut dire qu'il existe deux types de mailles, un type avec une distribution dense de protéines et un type sans protéines. Les parties denses réticulent donc tout le gel. La loi en $q^{-2.5}$ obtenue a déjà été observée pour des gels⁷³ et donc suggère un arrangement fractal des zones denses. Cette série de mesures

[72] Dubois, E. ; Boue, F. *Macromolecules* **2001**, 34, 3684-3697.

[73] Stauffer, D. ; Coniglio, A. ; Adam, M. *Adv. Polymer Sci.* **1982**, 44, 103.

montre tout l'intérêt des techniques de matching en diffusion de neutrons. La différence d'intensité entre les objet à petits q qui atteignent un facteur supérieur à 500 démontre la coexistence d'un système homogène (PSS) et d'un système hétérogène (lysozyme) dans la structure finale.

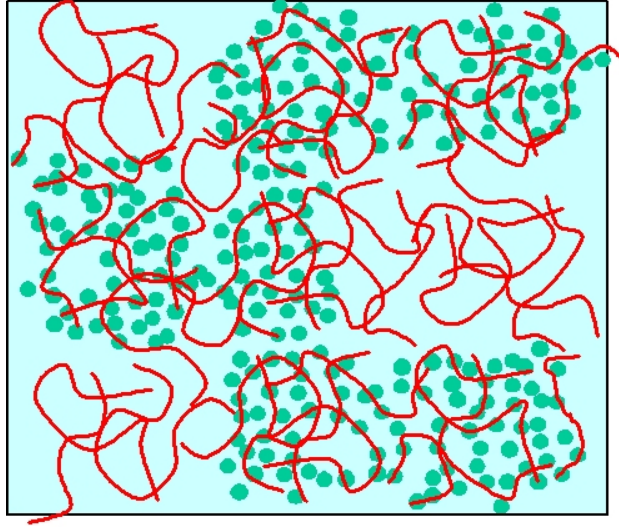


FIG. 4.19 – Représentation schématique de la structure des complexes avec les chaînes longues. Les chaînes de PSS sont représentées en rouge et les protéines en vert.

Des simulations ont été faites sur un système semblable par Carlsson et al.⁵⁴. Leur étude porte sur un nombre d'objets restreint du fait des capacités de calculs mais les structures de la simulation sont similaires à celles que nous observons, à savoir des protéines séparées les unes des autres mais attachées aux chaînes de polyélectrolyte. Nous rappelons que cette structure n'est observée que lorsque le rapport de charge introduit se situe au delà de 4.

4.2.2.2 Echantillons liquides : Complexes denses pour les chaînes courtes

Penchons nous maintenant sur les échantillons liquides qui correspondent ici aux échantillons avec les chaînes courtes ($N = 40$ et $N = 100$). Les différentes courbes de diffusion de neutrons sont présentées dans la figure 4.2.2.

Observons tout d'abord le signal de la protéine. A grands vecteurs d'onde le signal se superpose à celui du facteur de forme de la protéine native, elle conserve donc sa forme globulaire. Cependant à $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ un fort pic de corrélation est observé. Cette valeur de vecteur d'onde correspond dans l'espace réel à une distance d'environ 30 \AA (pour rappel :

[54] Carlsson, F.; Malmsten, M.; Linse, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3140-3149.

$2\pi/0.2 = 31 \text{ \AA}$). Le lysozyme étant une ellipsoïde de $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}$ ⁷⁴, cette distance est la plus petite distance de corrélation possible pour la protéine : un contact direct. Aux vecteurs d'onde intermédiaires l'intensité décroît en q^{-4} , ce qui correspond à la diffusion de la surface d'un objet dense tridimensionnel que nous appellerons complexe primaire. On peut donc en déduire que les protéines sont organisées en agrégats denses à cette échelle. Enfin aux plus petits vecteurs d'onde l'intensité décroît en $q^{-2.1}$. Il s'agit là de la dimension fractale à laquelle sont organisés les agrégats de protéines observés à échelle intermédiaire. Il est possible d'estimer leur taille via la valeur de vecteur d'onde à laquelle le signal passe d'une décroissance en q^{-4} à une décroissance en $q^{-2.1}$ (que nous appellerons q^{co}). Cette valeur est reliée à la taille du complexe par la relation :

$$R_{cp}q^{co} = \frac{4\pi}{4.53} \quad (4.6)$$

Avec une valeur de coupure à 0.03 \AA^{-1} , ce rayon de complexe primaire R_{cp} vaut 92 \AA , ce qui permet d'estimer la taille aux alentours de la centaine d'Angströms. Nous reviendrons plus en détail sur le calcul des tailles, des densités et des modes d'agrégation des complexes dans les chapitres 4 et 5 traitant plus particulièrement des chaînes courtes.

Le signal du contraste polyélectrolyte est également radicalement différent pour les chaînes courtes comparé aux chaînes longues qui conservaient un signal proche de celui des chaînes seules en régime semi-dilué. Il y a une très forte diffusion à petits vecteurs d'onde et le pic polyélectrolyte a totalement disparu. Seule subsiste la diffusion en q^{-1} caractéristique d'une conformation de type bâton à très grands vecteurs d'onde. Le réseau formé en régime semi-dilué a donc totalement disparu. Il faut également noter la présence à $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ d'un léger maximum. La diffusion à vecteurs d'onde intermédiaire et petits vecteurs d'onde est la même que celle du signal en contraste protéine, soit une décroissance en q^{-4} puis en $q^{-2.1}$. Cela signifie donc que les chaînes de polyélectrolyte et les protéines sont organisées de la même manière aux grandes échelles et aux échelles intermédiaires.

A partir de l'analyse des signaux issus des deux contrastes nous pouvons donc dire que dans le cas des chaînes courtes des complexes denses de taille finie de l'ordre de la centaine d'Angströms sont formés (puisque la diffusion en q^{-4} ne continue pas jusqu'aux plus petites valeurs de vecteur d'onde). L'organisation des protéines à l'intérieur de ces complexes denses n'est pas cristalline puisqu'une seule distance caractéristique a été observée : celle d'un contact direct entre deux protéines.

[74] Wilson, K. P.; Malcolmgl, B. A.; Matthews, B. W. *J. Bio. Chem.* **1992**, 267, 10842-10849.

Ces complexes primaires sont ensuite organisés de façon fractale à une échelle supérieure. La dimension fractale observée est 2.1, dimension caractéristique d'un mode d'agrégation de type agrégation colloïdale limitée par la réaction (Reaction Limited Colloidal Aggregation). La figure 4.20 donne une image de la structure obtenue sur une échelle de quelques centaines d'Angströms. Nous reviendrons également plus en détail sur ce point dans le chapitre 4.

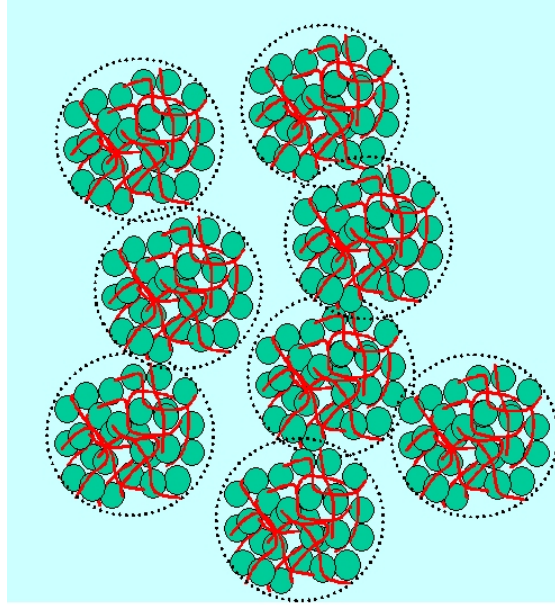


FIG. 4.20 – Représentation schématique de la structure des complexes avec les chaînes courtes. Les chaînes de PSS sont représentées en rouge et les protéines en vert.

Une fois de plus ces résultats sont en accord avec les résultats des simulations de Carlsson et al.⁵⁴ mais avec quelques restrictions. En effet dans ces conditions de tailles de chaînes courtes et de rapports de charge introduits proches de 1, les protéines ont une forte probabilité d'entrer en contact. La simulation aboutit à des clusters avec une probabilité de distance entre deux protéines ($g_{prot-prot}(r)$) maximale pour deux fois la taille de leur rayon. De plus la probabilité pour un monomère en bout de chaîne d'être complexé à la protéine est plus faible. Cela aboutit à des complexes "chevelus" avec des bouts de chaînes libres hors des complexes. Une fois de plus la limite du nombre d'objets impliqués dans le calcul (une soixantaine de protéines) ne permet pas une comparaison directe avec nos résultats, mais les structures trouvées ne semblent pas très éloignées de ces simulations. La seule différence notable est que ce résultat n'est valable dans les simulations que pour un rapport de charge introduit proche de 1.

4.2.2.3 Bilan

L'étude par diffusion de neutrons nous a donc permis de définir les deux structures correspondant aux deux états (gelé et liquide) des échantillons turbides. Les échantillons gelés sont donc en fait un réseau polyélectrolyte en régime semi-dilué avec ses mailles mais qui se retrouve figé du fait de la présence de la protéine qui va réticuler ce réseau. A l'inverse dans les échantillons liquides le polyélectrolyte est en régime dilué et de ce fait forme des complexes denses avec les protéines qui sont ensuite organisés à plus grande échelle. Nous rappellerons également ici que les différences d'intensité observées entre les signaux de protéine et de polyélectrolyte (≈ 500 pour les gels et ≈ 10 dans les globules denses) prouvent que le matching est parfait.

4.2.3 Conformation d'une chaîne dans le complexe : vers la compréhension de la transition gel-liquide

Maintenant que les deux types de structures correspondant aux deux états macroscopiques des échantillons turbides (gelé et liquide) ont été déterminés, il reste à comprendre comment le système passe d'un état à l'autre. Les mesures décrites en 4.2 montrent que le passage d'un état à l'autre est dépendant de la taille des chaînes. Cependant, le diagramme d'état pour les chaînes longues a également montré (comme vu en 4.2.1) que celles-ci peuvent former des échantillons liquides turbides. L'explication la plus plausible, déjà avancée ci-dessus, est un changement de l'état de dilution des chaînes de PSS. Mais dans le cas de chaînes à $N = 800$ monomères (cf 4.2.1), la limite du régime semi-dilué ne correspond pas à la limite de changement d'état macroscopique des échantillons. Or à part la taille des chaînes, c'est la longueur de persistance du polyélectrolyte qui définit le c^* limite entre le régime dilué et semi-dilué (voir eq. 4.2 à 4.4). On a donc décidé de mesurer la valeur de la longueur de persistance à l'intérieur des complexes denses gelés et également pour le polyélectrolyte seul afin de vérifier la longueur de persistance de 50 \AA annoncée par la littérature dans nos conditions. Cette mesure va permettre de recalculer un nouveau c^* et de voir si il correspond à la frontière observée macroscopiquement.

En fait il est possible de mesurer la conformation d'une seule chaîne au sein des complexes. Nous avons donc effectué une expérience de variation de taux de chaînes marquées comme expliqué dans le chapitre 3 pour mesurer son facteur de forme. Nous avons choisi des chaînes de 800 monomères et nous nous sommes placés à un rapport de charge introduit de 3.33. C'est à notre connaissance la première fois que le facteur de forme d'un polyélectrolyte est mesuré au sein d'un système mixte.

4.2.3.1 Conformation du polyélectrolyte seul

Nous allons tout d'abord valider la méthode sur des chaînes sans protéines dont le facteur de forme est déjà connu. La figure 4.21 présente les quatre courbes expérimentales correspondant au polyélectrolyte seul en solution à 0.1 M (concentration introduite pour atteindre un rapport de charge de 3.33) avec des taux de chaînes deutériées de 25, 50, 75 et 100 % ainsi qu'un témoin avec aucune chaîne deutériée.

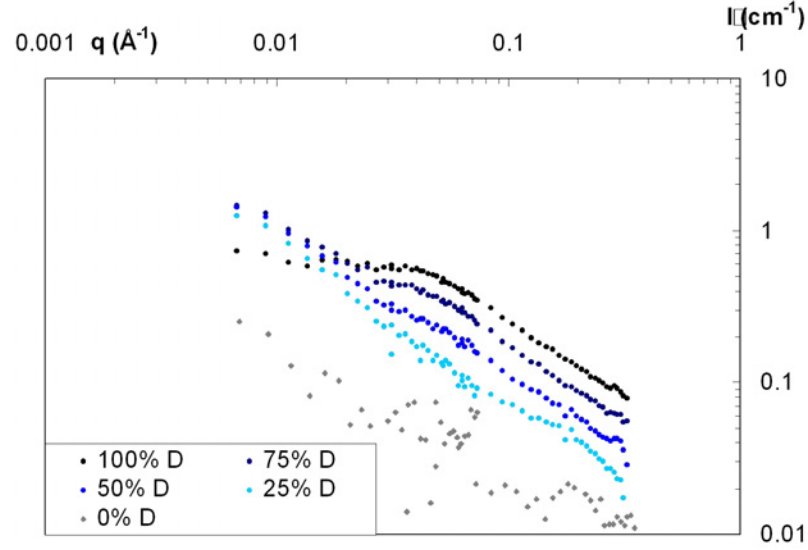


FIG. 4.21 – Courbes de diffusion du polyélectrolyte seul aux quatre taux de marquage et témoin totalement hydrogéné décalées d'un facteur 10

On peut observer sur cette première courbe que lorsqu'on s'approche de 0 % de chaînes deutériées, le pic de structure disparaît. De plus la diffusion du témoin à 0 % est très faible et donc valide l'hypothèse que les chaînes hydrogénées ne sont pas visibles. Cette courbe devrait être totalement plate du fait de l'absence théorique de contraste entre le solvant et les deux composés mais dans ce cas il est possible que les contre-ions Na condensés créent un léger marquage.

Pour mieux observer ces phénomènes et obtenir le facteur de forme du polyélectrolyte, il est nécessaire de représenter ces courbes divisées par la fraction en chaînes deutériées (fig. 4.22). On observe ici plus facilement qu'à grands vecteurs d'onde les quatre signaux sont identiques au contraste près. Puis pour des valeurs de vecteur d'onde inférieures à 0.05 \AA^{-1} les courbes sont sensibles au pic polyélectrolyte et donc au trou de corrélation qui le suit. La diffusion est d'autant plus forte qu'elle n'est pas perturbée par ce facteur de structure c'est pourquoi les courbes avec le moins de chaînes deutériées ont une plus grande diffusion à petits vecteurs d'onde. Puis une fois ces courbes obtenues en I/ϕ il est possible d'effectuer

l'extrapolation à concentration en chaînes deutériées nulle. Pour rappel, comme celà a été expliqué dans le chapitre 3, le signal en fonction du taux de chaînes deutériées s'écrit de la manière suivante :

$$I(q)/\Phi_D = S_1(q) + \Phi_D S_2(q) \quad (4.7)$$

Avec $S_1(q)$ le facteur de forme et $S_2(q)$ le facteur de structure des chaînes de PSS.

L'extrapolation à $\Phi_D = 0$ nous donne donc S_1 et ce pour chacune des valeurs de vecteur d'onde mesurée. Sur la figure 4.22 sont représentées les différentes courbes en I/Φ_D du polyélectrolyte seul en solution ainsi que la courbe extrapolée à Φ_D nul. Sont également données en exemple quatre valeurs de vecteur d'onde avec l'extrapolation correspondante (les points correspondants à ces exemples apparaissent pleins sur la courbe extrapolée). On peut noter que les valeurs à 25% sont un peu trop élevées du fait du manque de statistique sur ces points. Néanmoins les trois autres taux de marquage permettent d'obtenir une extrapolation correcte.

Comparons maintenant cette courbe extrapolée avec les quatre autres courbes. Comme dit précédemment, jusqu'à $q = 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ l'intensité n'étant pas sensible au facteur de structure, toutes les courbes se superposent et donc à fortiori la courbe extrapolée également. Pour des vecteurs d'onde plus petits, nous voyons plus clairement que lorsque le taux de chaînes deutériées baisse, le signal est plus intense. Le signal inter-chaînes, qui est en fait négatif, est en effet dans ce cas de moins en moins important puisque les chaînes marquées sont de plus en plus isolées. A terme, l'extrapolation à concentration en chaînes marquées nulle donne donc le facteur de forme de la chaîne.

Une représentation plus pertinente de la courbe de diffusion extrapolée est la représentation de Kratky ($Iq^2 = f(q)$). Elle permet une visualisation aisée des domaines de vecteurs de diffusion correspondant aux régimes caractéristiques (q^{-2} , q^{-1} , etc) des facteurs de forme de polymères. Dans notre cas, elle permet de montrer que la courbe expérimentale peut être parfaitement ajustée par une modèle de chaîne vermiforme et d'obtenir ainsi la longueur de persistance de la chaîne. En effet dans le modèle de Kratky-Porod⁷⁵, une chaîne vermiforme possède une courbure continue. Cette courbure est telle que si Ψ est l'angle entre les tangentes en deux points de la chaîne séparés d'une distance de contour l , $\langle \cos \Psi \rangle$ varie comme $\exp(-l/l_p)$ où l_p est la longueur de persistance.

Le modèle de chaînes vermiformes pour les polyélectrolytes dit que si les chaînes ont une taille finie alors la fonction $P(q)$ est limitée par la taille des chaînes aux petits angles. Sharp

[75] Kratky, O.; Porod, G. *Rec. Trav. Chim.* **1949**, *68*, 1106-1123.

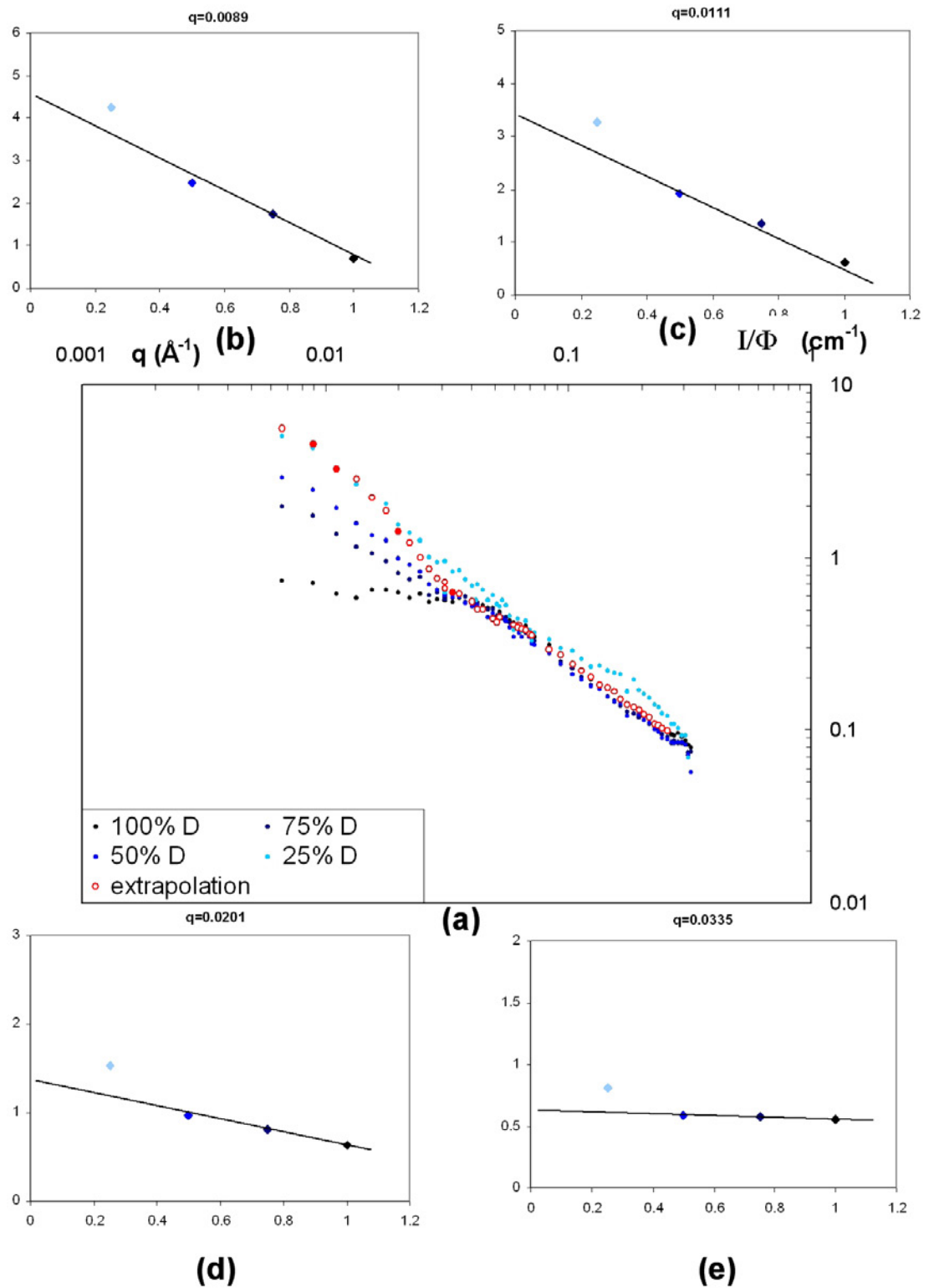


FIG. 4.22 – Figure (a) : courbes de diffusion en I/ϕ et extrapolation du facteur de forme pour le PSS seul. Courbes (b) à (e) : exemples d'extrapolation pour quatre valeurs de q .

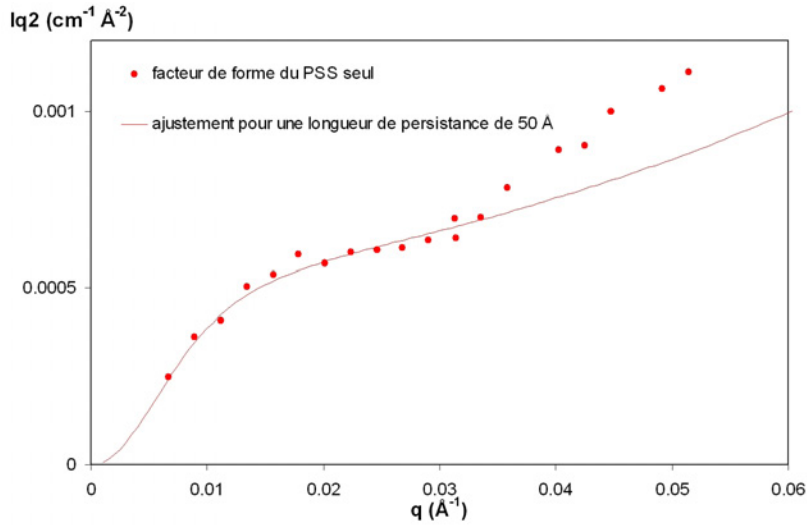


FIG. 4.23 – Facteur de forme extrapolé du PSS seul et ajustement en représentation de Kratky

et Bloomfield⁷⁶ donnent l'expression suivante :

$$S_1(q) = \frac{2(\exp(-x) + x - 1)}{x^2} + \left[\frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left(\frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) \exp(-x) \right] \frac{2l_p}{L} \quad (4.8)$$

avec $x = \frac{Lq^2 l_p}{3}$. L étant la longueur de la chaîne. Cette expression est valable tant que $ql_p < 4$. Elle permet d'ajuster toute la partie de la courbe située aux petits vecteurs d'onde. Lorsque $ql_p > 4$ alors le signal de diffusion suit une loi asymptotique (Des Cloizeaux⁷⁷) :

$$S_2(q) = \frac{\pi}{qL} + \frac{2}{3q^2 L l_p} \quad (4.9)$$

La longueur de notre chaîne étant fixée, un seul paramètre est variable pour ajuster la courbe expérimentale, il s'agit de la longueur de persistance. Sur la courbe 4.23 sont représentées la courbe extrapolée ainsi que son ajustement avec le modèle présenté ci-dessus en représentation de Kratky. Cet ajustement nous a permis de trouver une longueur de persistance de 50 Å environ. Cette valeur est cohérente avec les valeurs annoncées dans la littérature pour une concentration et une force ionique équivalentes⁷¹. Elle provient d'une combinaison de la longueur de persistance intrinsèque de la chaîne due à la rigidité des liaisons et de la longueur de persistance électrostatique due aux répulsions entre monomères chargés. De plus cet ajustement est effectué en unités absolues avec les bons préfacteurs de

[76] Sharp, P.; Bloomfield, V. *biopolymers* **1968**, 6, 1201-1211.

[77] Cloizeaux, J. d. *Macromolecules* **1973**, 6, 403.

masse et de contraste.

4.2.3.2 Conformation dans le mélange polyélectrolyte-protéine

Nous avons effectué la même série de mesures sur des échantillons de mélange polyélectrolyte-protéine avec un rapport de charge introduit de 3.33, un pH de 4.7 et une force ionique de 50 mM.

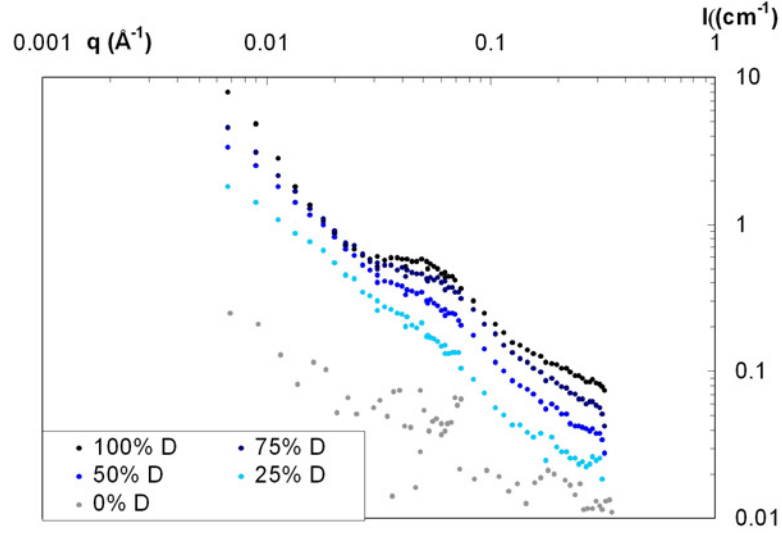


FIG. 4.24 – Courbes de diffusion du polyélectrolyte dans les complexes aux quatre taux de marquage et témoin totalement hydrogéné décalées d'un facteur 10

Sur la courbe 4.24 sont représentées les quatre courbes correspondant aux quatre taux de chaînes marquées. Il est possible de noter immédiatement que les courbes obtenues sont très proches de celles du polyélectrolyte seul. Cela confirme les mesures présentées en 4.2.2.1. On observe uniquement un décalage de la zone sensible au pic de corrélation vers les plus petites valeurs de vecteur d'onde. Comme dans le cas du polyélectrolyte seul, plus le taux de chaînes marquées est faible, plus le signal de diffusion est fort aux petits q en I/ϕ .

L'extrapolation à concentration en chaînes marquées nulle a également été effectuée sur cette série d'échantillons. La figure 4.25 montre les différentes courbes divisées de leur taux en chaînes marquées ainsi que la courbe extrapolée. Sont également données en exemple quatre valeurs de vecteur d'onde avec l'extrapolation correspondante (les points correspondants à ces exemples apparaissent pleins sur la courbe extrapolée).

Comparons maintenant la courbe extrapolée aux quatre autres courbes. Les courbes se superposent assez bien à grands q où une diffusion en q^{-1} est observée. A partir de $q = 0.04 \text{ \AA}^{-1}$ le signal augmente comme dans le cas du polyélectrolyte seul, ceci étant dû une fois de

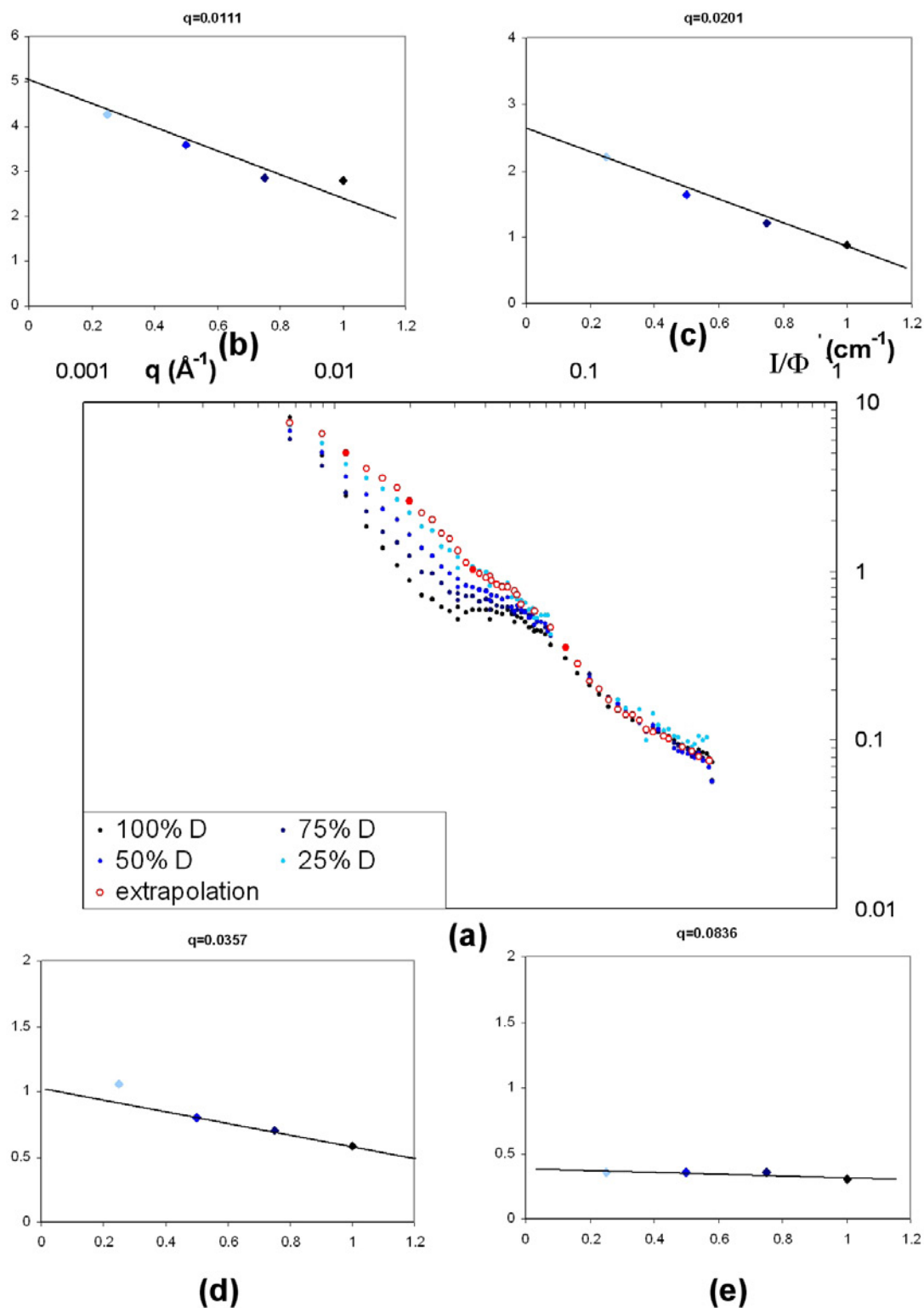


FIG. 4.25 – Figure (a) : courbes de diffusion en I/ϕ et extrapolation du facteur de forme pour le PSS dans les complexes. Courbes (b) à (e) : exemples d'extrapolation pour quatre valeurs de q .

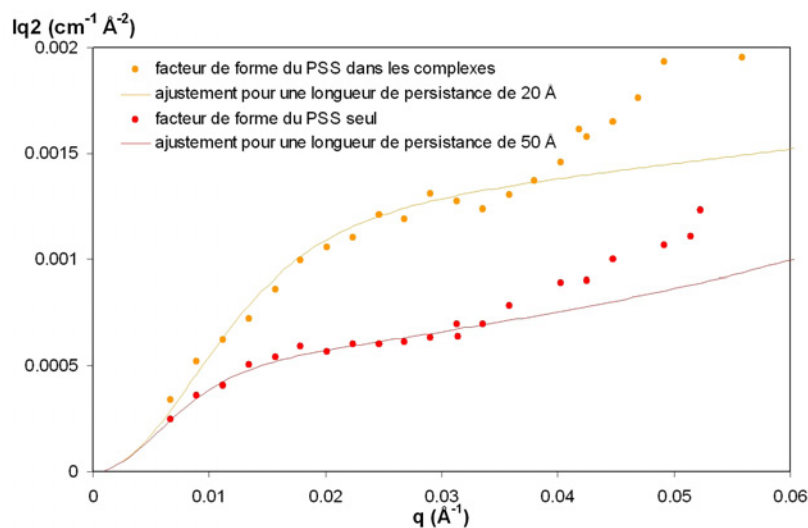


FIG. 4.26 – Facteur de forme extrapolé du PSS seul et dans les complexes et leurs ajustements en représentation de Kratky

plus au fait que lorsque le taux de chaînes marquées tend vers zéro, le facteur de structure (et son trou de corrélation) ne tend plus à faire chuter la diffusion après le pic de corrélation. Celui-ci disparaît également dans la courbe extrapolée.

La figure 4.26 montre le facteur de forme en représentation de Kratky avec son ajustement pour le PSS seul et dans les complexes. Il est possible de voir directement que la longueur de persistance dans le complexe a changé non seulement en comparant les valeurs de l'inflexion le long de l'axe des q mais encore l'intensité du plateau le long de l'axe des intensités. La position de l'inflexion a lieu vers $q = 0.025 \text{ Å}^{-1}$ pour le PSS dans les complexes contre $q = 0.015 \text{ Å}^{-1}$ pour le PSS seul. La valeur du plateau, proportionnelle, est de $0.005 \text{ Å}^{-2}\text{cm}^{-1}$ pour le PSS seul contre $0.012 \text{ Å}^{-2}\text{cm}^{-1}$ pour le PSS dans les complexes. La longueur de persistance a donc chuté de façon indéniable. L'ajustement de la courbe du facteur de forme du PSS en intensité absolue dans le complexe permet de déterminer cette nouvelle valeur de longueur de persistance qui est mesurée comme étant de 20 Å environ contre 50 Å pour le PSS seul.

Le fait de créer les complexes avec la protéine a donc engendré une baisse d'un facteur supérieur à 2 dans cette longueur de persistance. Cette longueur de persistance correspondrait à une salinité de 1.5 M pour un PSS seul à 0.17 M et est très proche de la longueur de persistance intrinsèque des chaînes de PSS (10 Å^{78}). Comme l'augmentation de force ionique due aux contre-ions de la protéine est de 0.03 mol/L , la modification de longueur de persistance ne peut être liée à une réduction de la longueur de Debye dans le système due

[78] Brûlet, A.; Boué, F.; Cotton, J. *J. Phys. II* **1996**, 6, 885-891.

au seul apport des contre-ions des protéines en terme d'écrantage. Nous n'avons pas inclus les protéines dans le calcul de la longueur de Debye puisque leur taille est très supérieure à la longueur de Debye dans le système ($\approx 10 \text{ \AA}$ pour un électrolyte 1 – 1 à 0.1 M). **Ce résultat confirme donc l'enroulement des chaînes autour des protéines puisque la longueur de persistance a drastiquement changé**, résultat qui était jusque là supposé du fait du déplacement du pic polyélectrolyte. Ce déplacement n'était qu'un indice indirect de ce changement de conformation qui a été ici mesuré précisément.

Il est probable que dans ce système la longueur de persistance mesurée soit une mesure moyenne, somme des longueurs de persistance des parties de chaînes enroulées sur les protéines et des parties de chaînes libres. On obtiendrait ainsi environ 30 % de chaînes libres, ce qui donne une concentration en chaînes libres supérieure au c^* des chaînes. A partir des concentrations en protéines et de chaînes enroulées, on peut estimer qu'il y a environ 23 monomères par protéine, soit largement plus que de charges portées par la protéine. Par ailleurs, le périmètre d'une protéine étant d'environ 100 \AA , la longueur bout à bout du nombre moyen de monomères adsorbés ($\approx 50 \text{ \AA}$) est inférieure au périmètre d'une protéine ($\approx 100 \text{ \AA}$). Les chaînes ne s'enroulent donc que partiellement autour des protéines, ce qui laisse possible la formation d'un gel par les régions non enroulées.

A partir de la valeur de la longueur de persistance mesurée, il est possible d'évaluer la taille de chaîne à partir de laquelle le système va passer de régime dilué à régime semi-dilué pour 40 g/L de lysoszyme et 0.1 M de PSS (equations 4.2 à 4.4). Le calcul donne $N = 500$, ce qui correspond cette fois à l'ordre de grandeur de la taille de transition entre les deux régimes (le régime intermédiaire est obtenu pour $N = 330$ sur la figure 4.2.2).

4.2.3.3 Transition liquide-gel

Nous venons de voir que le seuil liquide-gel est lié à la concentration c^* en chaînes. Nous avons également vu en 4.2.1 que les chaînes longues passent d'un état macroscopique gel à un état liquide en dessous d'un seuil de concentration en polyélectrolyte. Cette limite se trouvait aux alentours de 0.05 M de PSS. Nous voulons maintenant affiner cette observation en faisant varier la concentration en chaînes autour de c^* . Nous avons donc mesuré une série d'échantillons correspondants à cette transition dans le contraste protéine où la différence nette est la présence ou non d'un pic de corrélation entre protéines à 0.2 \AA^{-1} .

Nous montrerons dans le chapitre 4 dédié à la structure des globules denses que lorsque le rapport de charge introduit est inférieur à 1 (ici pour 0.015 mol/L en PSS et 0.02 mol/L en PSS), il reste de la protéine libre non agrégée en solution qui contribue au signal à grands q mais pratiquement pas aux petits q puisque sa diffusion est très inférieure à celle des complexes. Le signal de cette protéine libre peut se soustraire après dosage par UV. Cette

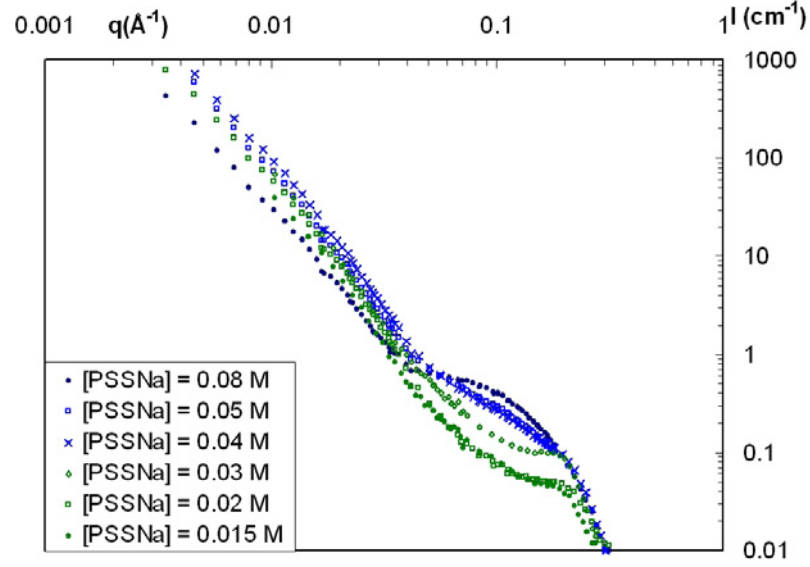


FIG. 4.27 – Courbes de diffusion de protéine pour six concentrations en PSS $N = 800$ monomères. Les courbes à 0.015 M et 0.02 M sont présentées soustraites de la protéine libre.

soustraction a donc été effectuée ici sur les courbes correspondants aux deux concentrations les plus faibles. L'intensité à très grands q , là où le signal n'est plus sensible qu'à la forme de la protéine est donc inférieur à celle des autres concentrations en polymère.

On voit directement que trois structures sont présentes dans ces échantillons : celle observée pour les chaînes longues à des concentrations supérieures à 0.05 M où la protéine n'a des hétérogénéités de diffusion qu'au delà de $q = 0.04 \text{ Å}^{-1}$, celle observée pour les chaînes courtes où un pic de corrélation est visible pour $q = 0.02 \text{ Å}^{-1}$ et enfin une dernière intermédiaire où le pic à $q = 0.02 \text{ Å}^{-1}$ n'est plus présent mais où la diffusion à petits q est toujours importante. Les concentrations de transition où le système passe d'un régime à l'autre sont 0.04 M et 0.08 M.

Si nous reprenons le calcul présenté en 4.2.1, le passage du régime semi-dilué au régime dilué pour un PSS avec $N = 800$ monomères et une longueur de persistance de 50 Å se situe à une concentration de 0.02 M. On peut donc noter que cette transition n'influe pas sur la structure finale du système puisque la première transition n'apparaît qu'à 0.04 M. Nous venons cependant de voir qu'à l'intérieur des complexes cette longueur de persistance est abaissée du fait de la présence des protéines sur les chaînes de polyélectrolyte à une valeur de 20 Å environ. Si nous recalculons la valeur de c^* avec cette longueur de persistance, le résultat obtenu est 0.08 M ce qui correspond bien à la valeur observée sur les courbes de

diffusion pour la transition vers le régime gel.

Cela explique ainsi le passage macroscopique d'un état gelé vers un état liquide. En effet si la concentration en polyélectrolyte est telle qu'il se retrouve en régime dilué après la formation des complexes, les chaînes sont séparées et la formation d'un gel n'est plus possible. Quant aux courbes pour les concentrations comprises entre 0.04 et 0.08 M, elles peuvent s'expliquer par le fait que cette longueur de persistance intra-complexe n'est en fait qu'une valeur effective. Il doit en effet exister une distribution de longueurs de persistance autour de cette valeur suivant qu'une partie de la chaîne soit ou non au contact d'une protéine. Il en résulte ainsi ce régime transitoire où doivent coexister les deux structures, de la même manière que pour les chaînes de taille $N = 330$ monomères vues en 4.2 qui sont également à cette transition pour une concentration en polyélectrolyte de 0.1 M.

4.2.4 Evolution temporelle

Les deux structures décrites en 4.2.2.1 et 4.2.2.2 sont les structures à l'état de quasi-équilibre. Mais nous avons vu grâce aux diagrammes d'état que les échantillons évoluent dans le temps et que donc ce n'est pas là la structure obtenue directement après le mélange. Nous pouvons discerner deux temps dans la formation de ces complexes : un premier rapide durant lequel les complexes sont formés directement après mélange et un deuxième plus long durant lequel ces complexes se réorganisent. Etant donné que tous les échantillons sont turbides au moment du mélange, cela signifie que les objets formés sont soit grands dans le cas des échantillons liquides soit comportent de grandes inhomogénéités dans le cas d'échantillons gelés. La réorganisation ultérieure des complexes peut quant à elle avoir lieu à deux échelles spatiales : soit à l'intérieur des complexes soit à plus grande échelle pour former de grands assemblages.

La réorganisation interne peut avoir lieu plus particulièrement si les complexes ne sont pas denses. En effet il est plus facile de trouver des configurations à l'intérieur de complexes ayant une plus grande fraction de solvant. Cette réorganisation est régie par les interactions électrostatique de la même manière que la première étape de complexation. On peut noter que le rapport de charge introduit a une influence très élevée sur ces possibilités de réorganisation, en effet lorsqu'il est proche de 1, la fraction volumique de solvant devient moins importante, minimisant ainsi les possibilités de réorganisation. A l'inverse, lorsque ce rapport augmente la fraction volumique de solvant augmente également. De plus les diagrammes de phase montre que la dilution n'influe pas sur le système puisque les frontières sont uniquement dépendantes des rapports de charge introduits. Cela explique pourquoi les échantillons formés avec un rapport de charge introduit inférieur à 5 n'évoluent pas à l'échelle macroscopique.

La réorganisation à plus grande échelle ne peut avoir lieu quant à elle que pour les com-

plexes denses. En effet lors de la formation des gels, les protéines sont directement distribuées de façon hétérogène dans le réseau polyélectrolyte qui se fige et ne peut donc plus évoluer à grandes échelles. Par contre pour les objets denses, ceux-ci une fois formés portent des charges à leur surface et peuvent interagir pour former des complexes plus grands. À terme ils forment des objets si grands qu'ils sont capables de sédimenter. Nous reviendrons sur l'évolution temporelle des systèmes formés de globules denses dans les chapitres suivants.

4.3 Résumé

Après avoir analysé les différents cas observés, nous pouvons dire que trois grandes structures se dégagent en fonction des concentrations des espèces introduites. Ce sont les structures macroscopiques gel turbide, liquide turbide et liquide limpide qui sont retrouvées dans les diagrammes d'état. Nous pouvons donc désormais dire qu'il y a des limites définies entre ces domaines qui dépendent du pH et de la taille des chaînes. La figure 4.28 donne ces limites entre les trois domaines en fonction des concentrations en chacune des espèces.

La frontière verticale entre turbide liquide et turbide gel dépend du c^* des chaînes dans les complexes et est fonction de la taille des chaînes comme nous l'avons vu en 4.2.3. Une taille de chaîne plus longue décalera le c^* vers les faibles concentrations en chaînes et permettra donc au domaine gel d'être plus important. Inversement, puisque les chaînes courtes ont un c^* plus élevé, il est possible que le régime gel ne soit jamais atteint si la frontière de dénaturation est atteinte en premier. Cette dernière qui délimite les zones turbide et limpide dépend elle directement du rapport de charge introduit et donc du pH qui fixe le nombre de charges sur la protéine (voir 4.1.1.3). Cette droite passe donc par zéro et sa pente détermine un rapport de charge fixe à un pH donné.

Nous pouvons à partir de là décliner ce diagramme suivant les tailles de chaînes utilisées et les pH pour expliquer les diagrammes d'état observés. Sur les diagrammes 4.29 et 4.30 sont représentés les diagrammes d'état théoriques pour des chaînes de PSS de 600 monomères à deux différents pH. Comme expliqué, un changement de pH aboutit à un changement de pente de la frontière. Ainsi à un rapport de charge donné (4 pour la frontière de dénaturation pour $N = 600$) la pente est d'autant plus forte que le pH est élevé. Ainsi la zone où la protéine est dénaturée, et donc les échantillons limpides, est beaucoup plus importante lorsque le pH est élevé. C'est ce que nous avons vu dans les diagrammes expérimentaux (voir photographie 4.7 et diagrammes 4.8 à 4.11).

Sur les figures 4.31 et 4.32 est montré l'effet de la taille des chaînes utilisées. Le fait d'avoir ces chaînes courtes a pour effet de décaler le c^* à une concentration qui ne peut pas

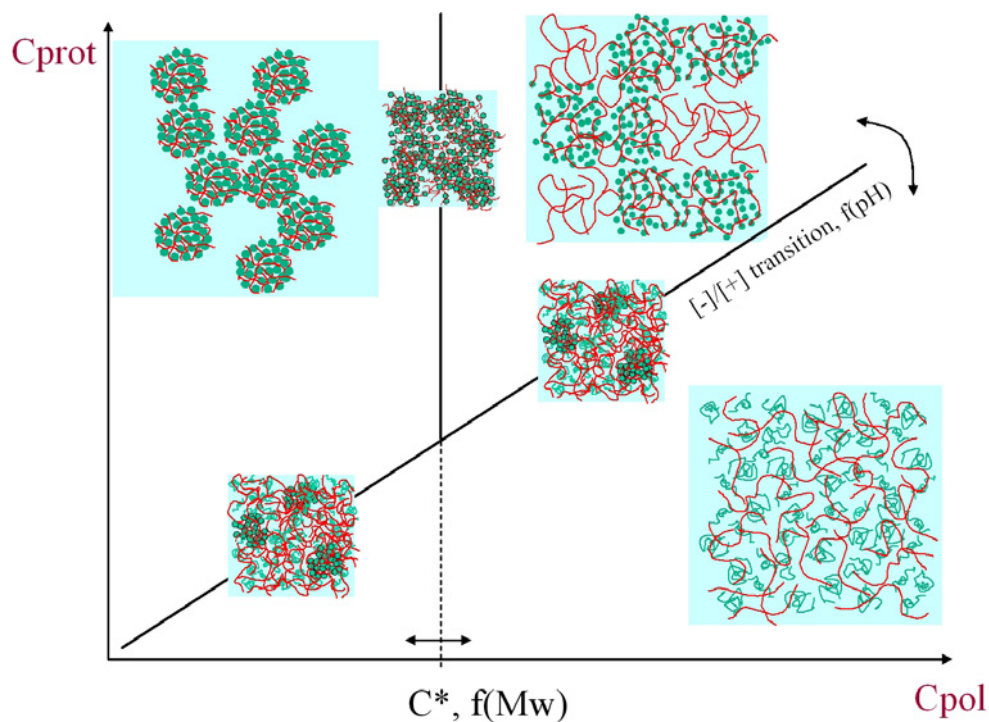


FIG. 4.28 – Diagramme d'état théorique en fonction de la concentration en chacun des composants : cas général.

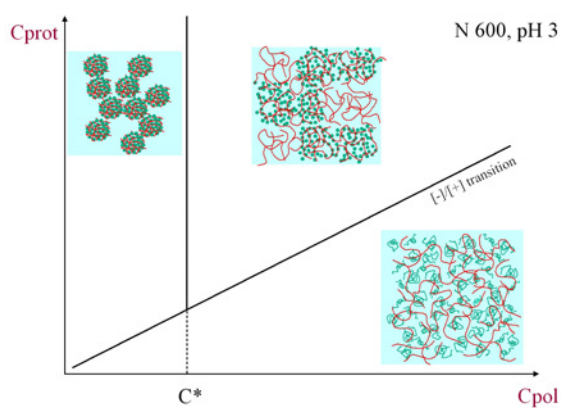


FIG. 4.29 – Diagramme d'état théorique pour $N=600$ et $pH=3$

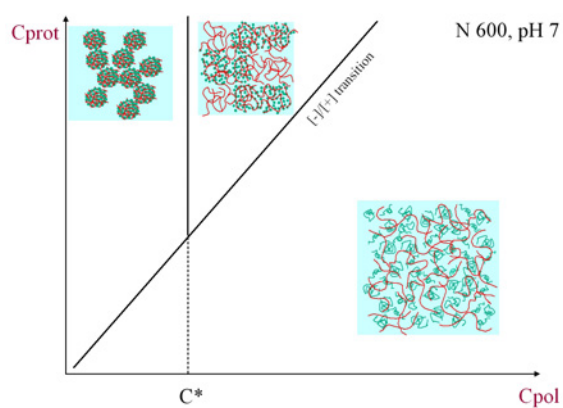


FIG. 4.30 – Diagramme d'état théorique pour $N=600$ et $pH=7$

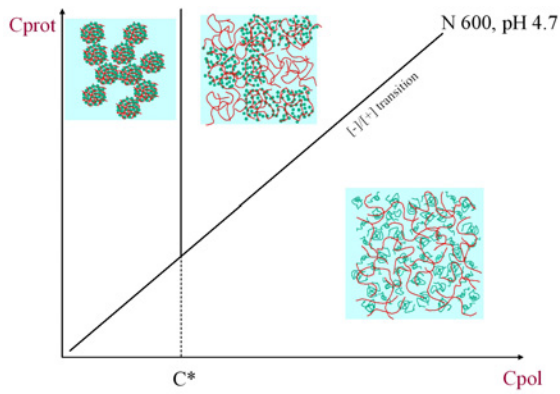


FIG. 4.31 – Diagramme d'état théorique pour $N=600$ et $\text{pH}=4.7$

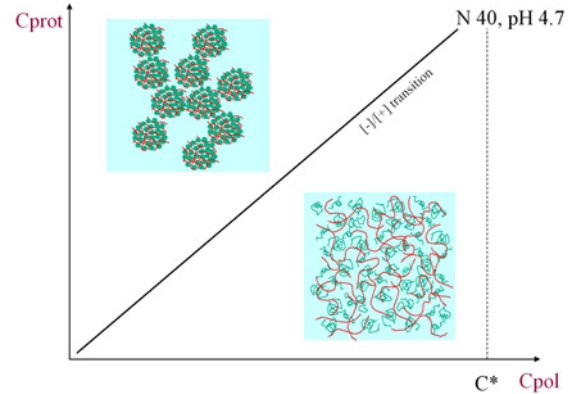


FIG. 4.32 – Diagramme d'état théorique pour $N=40$ et $\text{pH}=4.7$

être atteinte car la dénaturation a lieu d'abord (dans la limite de solubilité de la protéine et du polyélectrolyte). Ainsi le cas de la structure gel réticulé ne peut pas être observé. C'est sur ce cas que nous nous pencherons plus en détails dans les chapitres 4 et 5 à venir.

Après cette première partie de l'étude, nous pouvons donc déjà dire que les facteurs principaux qui régissent la complexation sont le rapport de charge introduit et la concentration en polyélectrolyte. Le rapport de charge introduit définissant si la protéine reste native ou est dénaturée et la concentration en polyélectrolyte définissant si les complexes formés sont des globules denses ou un gel. Nous allons maintenant dans les chapitres à venir déterminer plus précisément la structure des globules denses puis étudier les effets de plusieurs paramètres sur ceux-ci. Nous discuterons également des effets de salinité et nous reviendrons finalement sur la dénaturation.

Chapitre 5

Régime de globules denses (1) : caractérisation fine des structures

Nous avons vu au cours du chapitre précédent que les complexes formés lorsque les chaînes de PSS ne sont pas interpénétrées ou ne le restent pas après interaction avec les protéines sont des objets compacts de forme définie. Dans des systèmes protéines/polyélectrolytes d'intérêt pratique (stabilisation de mousses en agroalimentaires, pharmacologie...), ce régime "dilué" est très souvent présent. Par ailleurs, la plupart des études expérimentales le concernent ainsi que la totalité des simulations ou des prédictions théoriques (cf chapitre 1). Nous allons donc nous focaliser sur les mécanismes de formation de ces globules denses au cours des deux prochains chapitres.

Expérimentalement, nous avons choisi de prendre des chaînes courtes ($N = 40$) pour l'étude afin de pouvoir utiliser des concentrations élevées en objets tout en restant loin du c^* effectif des chaînes. Dans ce premier chapitre, nous avons choisi d'étudier 4 cas caractéristiques (stoechiométrie de charge, faible excès de protéine ou de polyélectrolyte) à pH 4.7 pour une force ionique de 50 mM de rapports de charges introduits : 0.65, 1, 1.66 et 3.33. Nous montrerons comment la modélisation des courbes de DNPA permet de déterminer précisément la forme et la structure des complexes ainsi que le rapport de charge interne au sein des complexes. Nous montrerons également dans cette partie la localisation des contre-ions après la formation des complexes ainsi que des expériences de microscopie électronique à transmission après cryofracture afin de déterminer la structure des suspensions sur des échelles spatiales supérieures à celles accessibles à la diffusion de neutrons. Dans le chapitre suivant, nous généraliserons cette étude en déterminant l'évolution des structures en fonction des changements des paramètres initiaux (pH, concentration, taux de charge du polymère).

5.1 Résultats de DNPA et dosage des espèces libres

Tous les échantillons ont été réalisés à une concentration en lysozyme de 40 g/L et des concentrations respectives en PSS de 0.02 M ($[-]/[+]_{intro} = 0.65$), 0.03 M ($[-]/[+]_{intro} = 1$), 0.05 M ($[-]/[+]_{intro} = 1.66$) et 0.1 M ($[-]/[+]_{intro} = 3.33$).

5.1.1 Courbes expérimentales de Diffusion de Neutrons aux Petits Angles

Toutes les mesures de diffusion de neutrons qui suivent ont été réalisées sur des échantillons laissés au repos deux jours afin d'être le plus près possible de l'équilibre. Chacun des échantillons a été mesuré dans deux solvants : 100% D₂O pour éteindre le polyélectrolyte et ainsi voir le signal de la protéine et 43% D₂O / 57% H₂O afin d'éteindre la protéine et voir le signal du polyélectrolyte. Ces deux séries de spectres sont visibles dans les figures 5.1 et 5.2, respectivement. Pour les signaux de polyélectrolyte dans les rapports de charge introduits inférieurs à 1, les signaux étant trop faibles à grands q du fait des faibles concentrations, la gamme à grands q n'est pas représentée.

Nous allons dans cette partie uniquement décrire les courbes. Elles seront ensuite analysées plus en détail dans la partie 5.2 (il est à noter qu'une partie de ces courbes ont déjà été décrites (1.66 et 3.33 dans le chapitre précédent).

5.1.1.1 Solvant 100% D₂O : signal de la protéine

Les courbes sur la figures 5.1 sont représentées décalées d'un facteur 10 pour plus de clarté. On peut voir directement que les courbes pour des rapports de charge introduits supérieurs à 1 sont similaires dans toutes leurs caractéristiques.

Tout d'abord dans la gamme des grands vecteurs d'onde ($0.2 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.4 \text{ \AA}^{-1}$), le signal décroît en q^{-4} ce qui est typique d'objets denses possédant une interface nette avec le solvant. Il s'agit là en l'occurrence de la protéine en tant qu'objet individuel. Ce signal se superpose en effet parfaitement avec celui de la protéine mesurée seule en solution diluée (après normalisation à la concentration). On peut donc ainsi en conclure que la protéine garde sa forme globulaire native à l'intérieur des complexes.

Il apparaît ensuite un pic de corrélation pour une valeur de q de 0.2 \AA^{-1} qui correspond dans l'espace réel à une distance de 31 \AA soit à un diamètre de protéine. On peut donc en déduire que les protéines sont collées les unes aux autres. Néanmoins le fait que nous ne voyons pas d'ordre supérieur à ce pic montre que cette organisation n'est pas cristalline et que les protéines se touchent sans ordre particulier. Il est ensuite possible d'observer à une échelle

supérieure donc aux plus petits q ($0.02 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) une deuxième décroissance du signal en q^{-4} qui correspond aussi à des objets denses avec une interface nette mais nettement plus grands (les objets compacts sont formés par des agrégats de protéine comme nous le verrons dans le paragraphe 5.2).

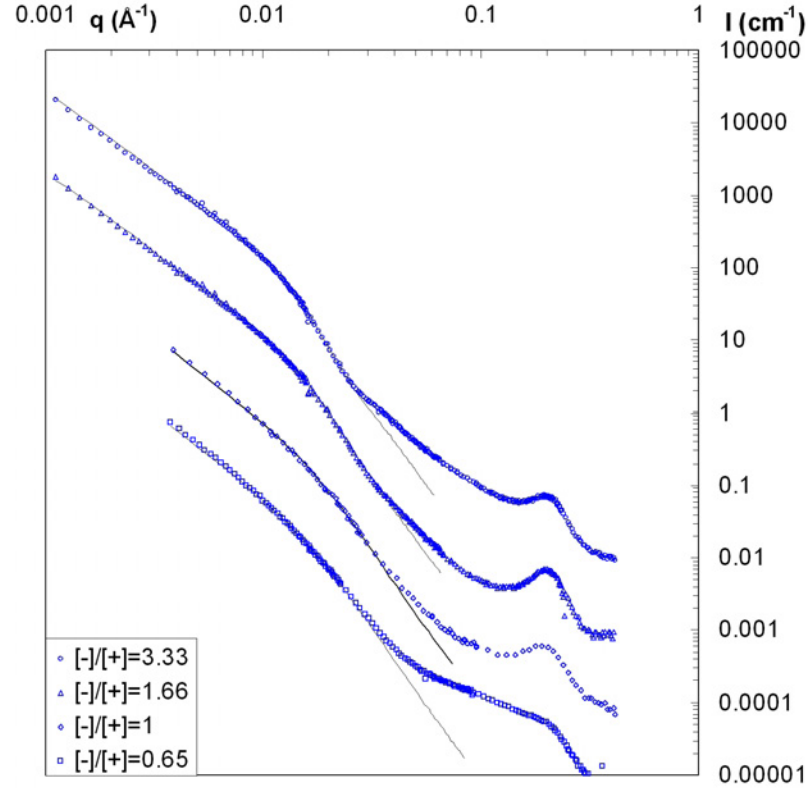


FIG. 5.1 – Courbes de diffusion de la protéine (40 g/L) à pH= 4.7 et des chaînes de PSS à N= 40 pour les rapports de charge 0.65, 1, 1.66 et 3.33 décalées d'un facteur 10

Enfin pour des valeurs de q inférieures à 0.02 \AA^{-1} , le signal ne décroît plus en q^{-4} (on dépasse la taille des agrégats élémentaires), mais décroît en $q^{-2.1}$. Cet exposant de décroissance est typique d'une dimension fractale d'agrégats ramifiés. La valeur de 2.1 est souvent rencontrée dans des systèmes d'agrégats de colloïdes chargés dont l'agrégation est limitée par la réaction (Reaction Limited Colloidal Aggregation)⁷⁹ et non par la diffusion (Diffusion Limited Colloidal Aggregation)⁸⁰. Etant donné la valeur de q jusqu'à laquelle cet exposant est observé ($q_{min} \approx 0.001 \text{ \AA}^{-1}$) on peut conclure que cette organisation se fait jusqu'à des échelles microniques. Ces échelles seront étudiées dans la partie 5.5. Il faut également remarquer que le q de coupure entre les deux régimes q^{-4} et $q^{-2.1}$ est d'autant plus petit que le

[79] Lin, M. Y.; Lindsay, H. M.; Weitz, D.; Ball, R. C.; Klein, R.; Meakin, P. *Physical review A* **1990**, 41, 2005-2020.

[80] Lin, M. Y.; Lindsay, H. M.; Weitz, D. A.; Klein, R.; Ball, R. C.; Meakin, P. *J. Phys. : Condens. Matter* **1990**, 2, 3093-3113.

rapport de charge introduit est grand. Cet aspect sera également discuté dans le paragraphe 5.2.

La courbe de rapport de charge introduit inférieur à 1 possède elle quelques différences dans la gamme $0.05 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$. En effet le pic à $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ n'est plus observé mais est remplacé par un épaulement observé vers $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$. Ceci est du à la présence de protéine libre en solution dont le signal se superpose à celui des complexes. Ceci sera expliqué plus en détail dans la partie 5.2. Néanmoins le reste du spectre reste très similaire ce qui dénote une structure globalement identique pour tous les complexes.

5.1.1.2 Solvant 43% D_2O / 57% H_2O : signal de polyélectrolyte

A nouveau les courbes obtenues en contraste polyélectrolyte sont toutes représentées décalées d'un facteur 10 pour plus de clarté (Figure 5.2).

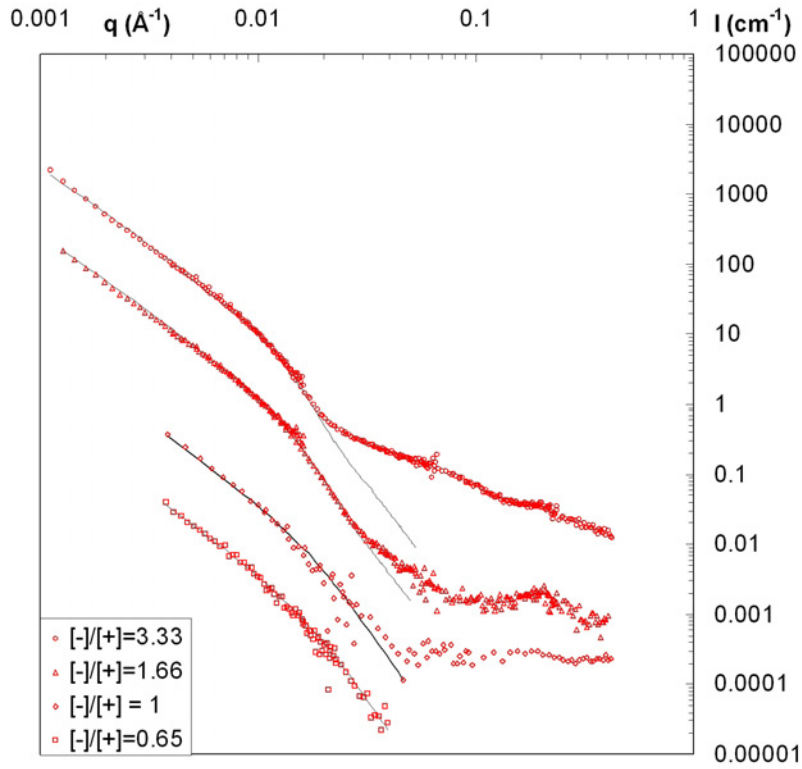


FIG. 5.2 – Courbes de diffusion du polyélectrolyte à pH= 4.7 et des chaînes de PSS à N= 40 pour les quatre rapports de charge choisis séparées d'un facteur 10

Il est possible d'observer des différences entre les spectres mais globalement ils possèdent les mêmes caractéristiques que les spectres de protéine : un pic à $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ (mais moins prononcé), une zone intermédiaire qui décroît en q^{-4} et enfin une partie finale à petits q

qui décroît en $q^{-2.1}$. Cette partie finale lorsque q est inférieur à 0.05 \AA^{-1} est d'ailleurs extrêmement similaire au signal de protéine. Cela signifie que les deux composés (protéine et polyélectrolyte) sont distribués et organisés de la même manière aux échelles correspondant aux complexes primaires. De plus la présence du pic à $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ démontre que les chaînes de polyélectrolyte sont plaquées sur les protéines ou insérées en même temps qu'elles dans les agrégats. Les signaux gardent par contre une décroissance en q^{-1} à très grands q , les répulsions inter-monomères donnant au polyélectrolyte un caractère de type bâton à très petite échelle.

Une différence flagrante apparaît pour le rapport de charge introduit $[-]/[+]_{intro} = 3.33$, il s'agit d'un épaulement autour de $q = 0.04 - 0.045 \text{ \AA}^{-1}$. Cet épaulement est dû au pic polyélectrolyte (q^*) qui est présent dans les signaux de solutions pures de PSSNa et qui résulte d'une distance inter-chaînes due aux répulsions électrostatiques. Le signal pour $[-]/[+]_{intro} = 3.33$ apparaît donc comme la somme du signal des complexes et d'un signal de chaînes libres en solution. Cette valeur de q^* est ici à plus petits q que celle d'une solution pure de PSSNa à 0.1 M ($q^* = 0.057$ pour 0.1 M). Ce pic varie en $c^{1/2}$ si le système est en régime dilué et en $c^{1/3}$ si il est en régime dilué^[81] et pour cette taille de chaînes, le c^* est de 0.09 mol/L (partie 2.1.2 du chapitre 3). Pour les rapports introduits inférieurs à 1.66 , ce pic a totalement disparu et donc il n'y a aucune chaîne libre. On peut donc estimer que pour le rapport 3.33 il y a au moins la moitié des chaînes impliquées dans les complexes et que les chaînes libres sont en régime dilué. On peut alors estimer la concentration en chaînes libres d'après $q^* \propto c^{1/3}$: on trouve entre 0.033 M à 0.05 M soit environ la moitié des chaînes introduites.

5.1.2 Dosages par spectroscopie UV

5.1.2.1 Principe

La spectroscopie UV consiste en l'étude de l'interaction de la lumière ultra-violette (de longueur d'onde λ comprise entre 200 et 400 nm) avec les molécules. Cette interaction n'a lieu qu'avec des molécules ou parties de molécules appelées chromophores. Ces molécules sont capables d'absorber une certaine longueur d'onde pour changer d'état d'énergie. Ainsi elles passent de leur état fondamental S_0 à un état excité S_1 . Ce saut d'état d'énergie demande une énergie finie et donc seule la longueur d'onde correspondant à cette valeur est absorbée (selon la loi de Plank $E = h\nu$ avec $h = 6.625 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$ et $\nu = c/\lambda$). La largeur de la bande d'absorption est ensuite due à des sous-états vibrationnels et rotationnels. L'absorption suit

[81] Williams, C.; Nierlich, M.; Cotton, J.; Jannink, G.; Boué, F.; Daoud, M.; Farnoux, B.; Picot, C.; deGennes, P.; Rinaudo, M.; Moan, M.; Wolff, C. *Journal of Polymer Science : Polymer Letters Edition* **1979**, *17*, 379-384.

la loi de Beer Lambert et peut être exprimée comme suit :

$$A(\lambda) = \log(I/I_0) = \epsilon(\lambda)lC \quad (5.1)$$

Avec I_0 l'intensité du faisceau incident, I l'intensité du faisceau transmis, ϵ le coefficient d'absorption à une longueur d'onde donnée, C la concentration en chromophore en mol/L et l le trajet optique en cm. Ainsi il est possible d'obtenir le spectre d'absorption d'un composé en fonction de la longueur d'onde λ .

Dans notre cas, les deux composés du système (lysozyme et PSSNa) possèdent des chromophores susceptibles d'absorber de la lumière dans le domaine des UV, nous avons donc choisi la gamme de longueur d'onde 240–320 nm. Dans cette gamme, le lysozyme possède des acides aminés qui absorbent à 275 nm (tyrosine), à 281 et 291 nm(tryptophane) (voir figure 5.3). Cette absorption est due à la présence de groupes aromatiques dans ces acides aminés dont les électrons peuvent être excités (cf figure 2.2). Le PSSNa possède lui un groupement aromatique couplé à une fonction sulfonate qui permet beaucoup d'états d'excitation, ainsi il absorbe à quatre longueurs d'onde dans la gamme choisie : 255, 261, 267 et 271 nm. Néanmoins ces pics d'absorption étant très proches il est difficile de les déconvoluer (voir figure 5.3).

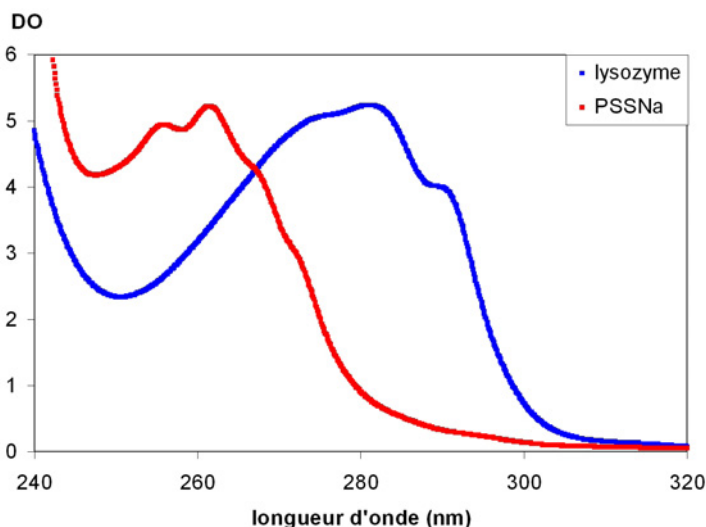


FIG. 5.3 – Spectres d'absorption UV du lysozyme à 20g/L (0.0015 M) et du PSSNa à 0.1M pour une épaisseur de 1 mm

Finalement il est possible de faire des analyses quantitatives grâce à la spectroscopie UV en faisant des droites d'étalonnage. Nous avons pour cela mesuré plusieurs échantillons de concentration fixée pour la protéine et le polyélectrolyte et choisi une longueur d'onde caractéristique d'absorption pour chacun d'eux. Afin de séparer au maximum les contributions

des deux composés nous avons choisi 261 nm pour le PSSNa et 281 nm pour le lysozyme. Les valeurs de coefficient d'absorption ϵ trouvées sont reportées dans le tableau 5.1. Dans le cas où les deux composés seraient présents en solution, il est nécessaire de séparer leurs contributions respectives. Il suffit pour cela de mesurer la densité optique aux deux longueurs d'onde choisies (261 nm et 281 nm) et puisque les absorptions sont additives, de résoudre deux équations à deux inconnues en tenant compte des coefficients d'absorptions des composés aux deux longueurs d'onde.

	PSSNa	lysozyme
$\epsilon_{261\text{nm}}$	485	22170
$\epsilon_{281\text{nm}}$	69	34750

TAB. 5.1 – Valeurs des coefficients d'absorption molaires UV pour le lysozyme et le PSSNa aux deux longueurs d'ondes choisies

5.1.2.2 Dosages des échantillons

Afin de mesurer précisément les concentrations de produit libre après formation des complexes, il est nécessaire de séparer les complexes du reste de la solution. Pour cela nous avons centrifugé les échantillons : les complexes étant assez denses, une centrifugation à 5000 G permet de les séparer de la solution. Le surnageant limpide est ensuite prélevé et dosé par UV pour mesurer les quantités de produit libre. Sont représentés dans la figure 5.4 les courbes de dosage UV pour les quatre échantillons étudiés et les valeurs en protéine et polyélectrolyte libre sont reportées dans le tableau 5.2.

	PSSNa	lysozyme
$[-]/[+]_{intro} = 0.65$	0	12 g/L
$[-]/[+]_{intro} = 1$	≈ 0	≈ 0
$[-]/[+]_{intro} = 1.66$	≈ 0	≈ 0
$[-]/[+]_{intro} = 3.33$	0.04M	4 g/L

TAB. 5.2 – Concentrations en espèces libres pour les surnageants des échantillons aux quatre rapports de charge

On voit donc clairement que : - pour les rapports introduits $[-]/[+]_{intro} = 1$ et $[-]/[+]_{intro} = 1.66$, les concentrations en espèces libres sont négligeables, que ce soit pour le polymère ou la protéine.

- pour le rapport de charge introduit inférieur à 1 ($[-]/[+]_{intro} = 0.65$), du lysozyme libre est présent en solution alors qu'il n'y a pas de PSS libre. Le taux de lysozyme libre est égal à 30% (12g/L pour 40g/L introduit).

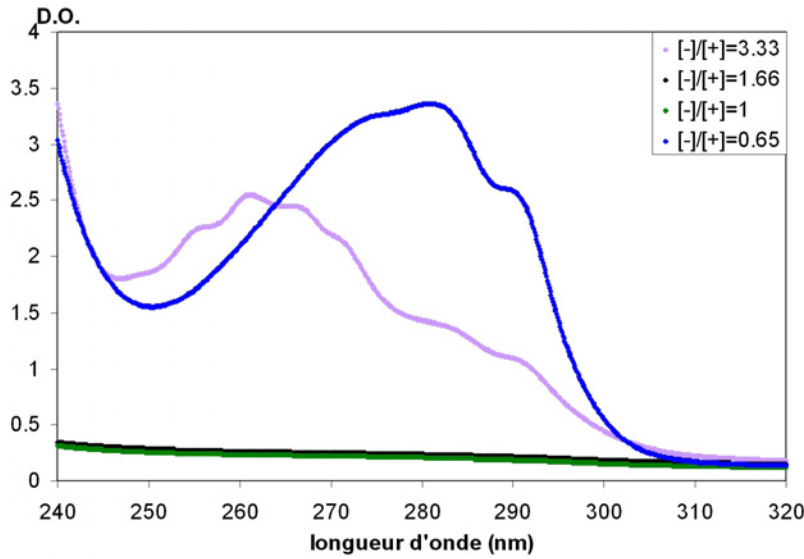


FIG. 5.4 – Courbes d’absorption UV pour les surnageants des échantillons aux quatre rapports de charge

- qu’à l’inverse lorsque le rapport de charge introduit est supérieur à 1.5, il y a présence de PSS libre et de peu de lysozyme libre. Dans ce cas le taux de PSS libre est de 40%. Cette valeur est cohérente avec la valeur obtenue à partir de la position du pic polyélectrolyte.

Cela donne une indication du fait que la complexation n’est pas totale et qu’une partie des espèces reste libre en solution. Les valeurs de produits libres mesurées vont permettre de séparer les contributions de ces produits libres et les contributions des produits complexés dans les signaux DNPA comme nous le verrons en 5.2.1.1.

5.2 Analyse des spectres DNPA

Connaissant les taux d’espèces libres à partir des mesures UV, nous pouvons analyser le signal des globules pour les quatre taux de charge introduits. Nous allons montrer que l’on peut déduire la composition interne et la distribution spatiale des espèces dans ces globules.

5.2.1 Signal du lysozyme (solvant D₂O)

5.2.1.1 Soustraction du signal de lysozyme libre

Pour améliorer l’analyse des signaux de diffusion des complexes, il est possible de soustraire le signal dû à la présence de lysozyme libre du signal total. Le signal à soustraire sera approximé à celui d’une solution diluée de lysozyme renormalisé à la concentration en protéine libre déterminée par dosage UV (voir tableau 5.2). Le facteur de forme du lyso-

zyme a été mesuré à 10 g/L, soit en régime dilué. Comme la concentration la plus élevée en protéine libre mesurée est 13 g/L, on peut considérer qu'on est toujours en régime dilué. Il n'y a donc pas de corrélations à longues distance et le signal est proportionnel au seul facteur de forme. La figure 5.5 (carré creux) montre le spectre obtenu pour le rapport de charge $[-]/[+]_{intro} = 0.65$ après soustraction : on y retrouve les caractéristiques habituelles des signaux obtenus pour des rapports de charge plus élevés, à savoir une décroissance en $q^{-2.1}$ à petits q , une décroissance en q^{-4} à q intermédiaires et un fort pic d'interaction à $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$. Ce pic était partiellement masqué par le signal du lysozyme libre qui mène à un épaulement à $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$. Il est à noter que pour des valeurs de vecteur d'onde inférieures à 0.05 \AA^{-1} , le signal du complexe est très largement supérieur à celui des protéines libres (de 10 à 1000 fois) et n'est donc absolument pas affecté par leur présence.

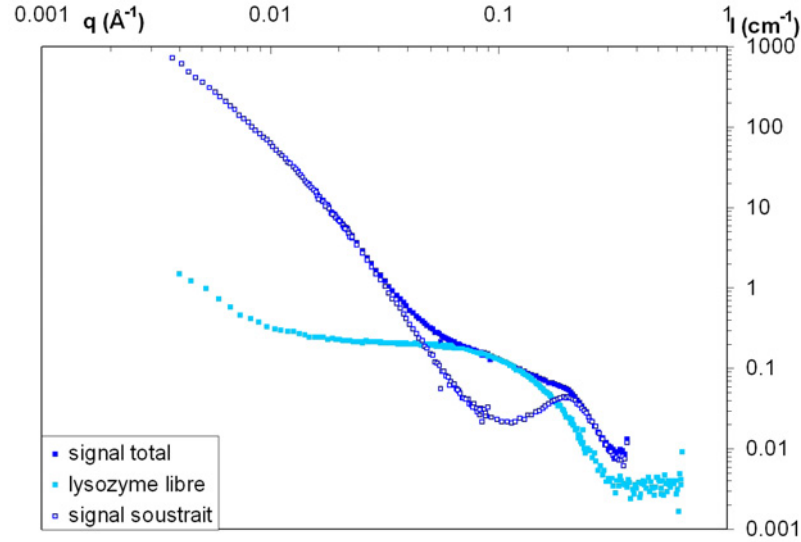


FIG. 5.5 – Signal de lysozyme dans le complexe avec et sans soustraction du signal de lysozyme libre pour l'échantillon $[-]/[+] = 0.65$

5.2.1.2 Taille des complexes et fraction volumique interne en protéine

Expression de la diffusion à petits vecteurs d'onde : contraste effectif du complexe primaire. Comme vu précédemment et confirmé après soustraction du signal de lysozyme libre, il existe deux régimes où le signal de la protéine décroît en q^{-4} . Cela révèle la présence de deux objets avec une interface bien définie à deux échelles : la protéine en tant qu'objet individuel à grands vecteurs de diffusion et les complexes primaires à petits

vecteurs d'onde. Ces complexes primaires sont un amas dense de protéines et de chaînes de polyélectrolyte. La frontière entre ces deux régimes se situe aux alentours de $q = 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ et nous considérons qu'en dessous de $q = 0.03 \text{ \AA}^{-1}$, le signal de diffusion n'est dû qu'aux complexes. Nous pouvons donc écrire pour $q < 0.03 \text{ \AA}^{-1}$:

$$I_{lyso}(q) = \Phi_{comp} \Delta \rho_{comp}^2 V_{comp} P_{comp}(q) S_{comp}(q) \quad (5.2)$$

où Φ_{comp} est la fraction volumique de complexes, V_{comp} leur volume, $\Delta \rho_{comp}^2$ le contraste effectif entre les complexes et le solvant, P_{comp} leur facteur de forme et S_{comp} leur facteur de structure.

Focalisons nous sur le terme $\Delta \rho_{comp}^2$ qui est la base de cette analyse. Il s'agit d'un contraste neutronique effectif c'est à dire la différence entre la densité de longueur de diffusion du solvant $\rho_{solvant}$ et une densité de longueur de diffusion moyenne du complexe ρ_{comp} qui peut être considéré comme homogène à l'échelle d'observation. Le complexe est formé de lysozyme de fraction volumique interne au complexe $\Phi_{lyso_interne}$ ainsi que de solvant et de polyélectrolyte de même densité de longueur de diffusion $\rho_{solvant}$ et de fraction volumique interne $(1 - \Phi_{lyso_interne})$. Nous pouvons donc écrire :

$$\rho_{comp} = \Phi_{lyso_interne} \rho_{lyso} + (1 - \Phi_{lyso_interne}) \rho_{solvant} \quad (5.3)$$

et donc le contraste du complexe par rapport au solvant se réduit à l'expression suivante :

$$\Delta \rho_{comp}^2 = (\rho_{comp} - \rho_{solvant})^2 = \Phi_{lyso_interne}^2 (\rho_{lyso} - \rho_{solvant})^2 = \Phi_{lyso_interne}^2 \Delta \rho^2 \quad (5.4)$$

A partir du titrage UV, nous connaissons la fraction volumique de lysozyme qui est incluse dans les complexes Φ_{lyso_comp} . La fraction volumique de complexe Φ_{comp} peut s'écrire :

$$\Phi_{comp} = \Phi_{lyso_comp} / \Phi_{lyso_interne} \quad (5.5)$$

L'équation 5.2 peut donc être réécrite telle que :

$$I_{lyso}(q) = \Phi_{lyso_comp} \Phi_{lyso_interne} \Delta \rho^2 V_{comp} P_{comp}(q) S_{comp}(q) \quad (5.6)$$

où Φ_{lyso_comp} est déjà déterminé par l'UV.

Accession au facteur de forme des complexes primaires et à la fraction interne en protéine. Nous faisons l'hypothèse que dans une gamme de q correspondant à l'échelle d'un complexe primaire, le signal de diffusion n'est dû qu'au facteur de forme de ce complexe globulaire ; c'est le cas dans la gamme de q où $I(q)$ décroît en q^{-4} . Et donc :

$$S_{comp}(q) \approx 1 \quad \text{pour} \quad 0.01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.03 \text{ \AA}^{-1} \quad (5.7)$$

Dans cette gamme de q , la représentation en $I(q)q^4 = f(q)$ de la figure 5.7 fait apparaître un maximum caractéristique du facteur de forme d'objets sphériques. Sa position est reliée au rayon moyen des sphères. Comme aucune oscillation n'apparaît dans le facteur de forme, la distribution des tailles est polydisperse et nous assumons qu'elle suit une loi de distribution lognormale :

$$P(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} \left(\ln \frac{R}{R_{comp}} \right)^2 \right] \quad (5.8)$$

avec R_{comp} le rayon le plus probable et σ la déviation standard. Le volume moyen des complexes primaires V_{comp_moyen} en tenant compte de la polydispersité est :

$$V_{comp_moyen} = \frac{4\pi}{3} R_{comp}^3 \exp \left(-\frac{9}{2}\sigma^2 \right) \quad (5.9)$$

Le signal expérimental correspondant à l'équation 5.6 avec $S_{comp}(q) = 1$ peut ainsi parfaitement être ajusté dans le domaine de q compris entre 0.01 \AA^{-1} et 0.03 \AA^{-1} en utilisant le facteur de forme moyen d'une sphère :

$$V_{comp}P_{comp}(q) = \frac{\int_0^\infty \frac{4\pi}{3} R^3 \left(3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 R^3 P(R) dR}{\int_0^\infty R^3 P(R) dR} \quad (5.10)$$

L'ajustement permet d'obtenir à la fois la fraction interne de lysozyme $\Phi_{lyso_interne}$ ainsi que la distribution de taille du complexe, soit son rayon le plus probable R_{comp} ainsi que la déviation σ . Les résultats sont listés dans le tableau 5.3.

Φ_{lyso_intra} , R_{comp} et σ peuvent être déterminés sans ambiguïté car ils sont décorrélés dans l'expression de l'intensité : R_{comp} est relié à la position en vecteur d'onde du pic, σ à l'ajustement de la forme du pic et Φ_{lyso_comp} à la valeur de l'intensité du plateau après le pic

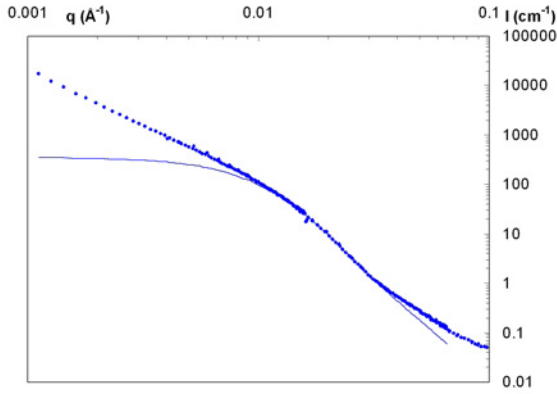


FIG. 5.6 – Ajustement du facteur de forme des complexes primaires en log-log

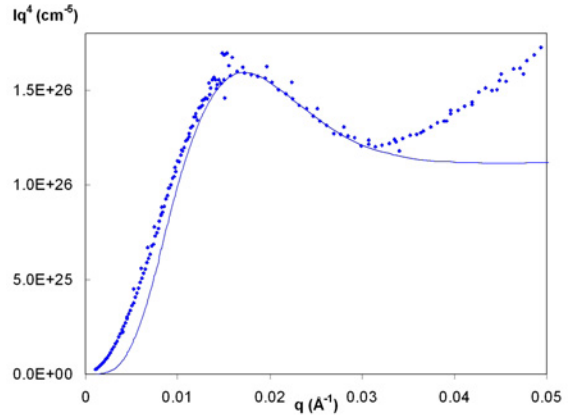


FIG. 5.7 – Ajustement du facteur de forme des complexes primaires en Iq^4

dans la représentation en $I(q)q^4 = f(q)$.

Il est très intéressant de noter que les tailles sont les mêmes pour $[-]/[+]_{intro} = 0.65$ et $[-]/[+]_{intro} = 1$.

	Φ_{lyso_intra}	R_{comp}	σ
$[-]/[+]_{intro} = 0.65$	0.24	73	0.45
$[-]/[+]_{intro} = 1$	0.19	73	0.45
$[-]/[+]_{intro} = 1.66$	0.27	114	0.37
$[-]/[+]_{intro} = 3.33$	0.3	154	0.31

TAB. 5.3 – Taille et teneur en protéine des complexes primaires pour les quatre rapports de charge

5.2.1.3 Facteur de structure entre les complexes primaires

Le facteur de structure entre les complexes primaires $S_{comp}(q)$ est différent de 1 à petits q . Dans ce domaine de vecteur d'onde il peut être calculé à partir de l'équation 5.6 en divisant le signal par le facteur de forme $P_{comp}(q)$ déterminé précédemment. $S_{comp}(q)$ est représenté dans la figure 5.8 pour $[-]/[+]_{intro} = 1.6$. Par principe il vaut 1 pour $0.01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.03 \text{ \AA}^{-1}$; à petits q il décroît en $q^{-2.1}$. Cette valeur d'exposant nous donne la dimension fractale D_f des agrégats de complexes primaires car il est connu que $I(q)$ diffuse en q^{-D_f} pour une structure fractale de dimension D_f ^[82]. Nous avons donc choisi de modéliser le facteur de structure de la façon suivante :

$$S(q) = (q_c^{D_f})q^{-D_f} \text{ pour } q < q_c; \quad S(q) = 1 \text{ pour } q > q_c \quad (5.11)$$

[82] Cabane, B. *Neutron, X-Ray and Light Scattering, North-Holland, Delta Series, Elsevier Science Publisher* **1991**, 247.

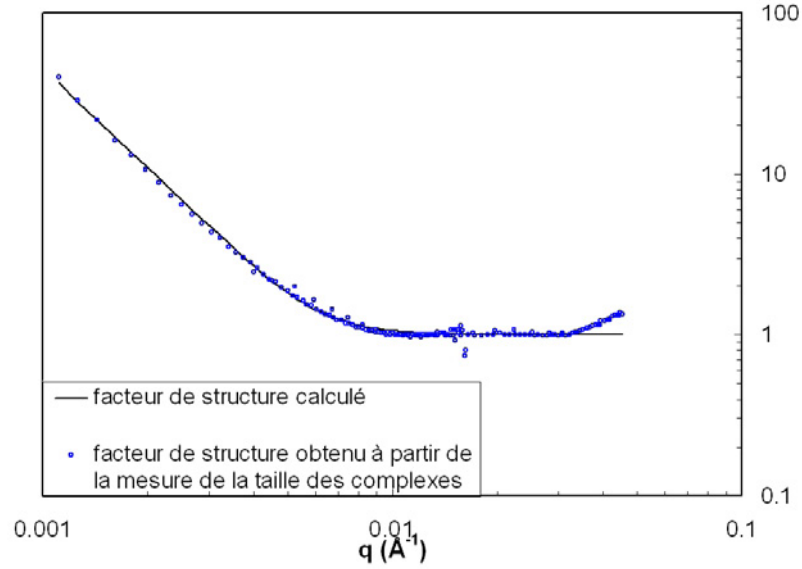


FIG. 5.8 – Facteur de structure des complexes primaires

où q_c est le vecteur d'onde de coupure à partir duquel la structure peut être considérée comme fractale.

Cette valeur de q_c correspond, à un rayon donné, à deux fois le diamètre des complexes ($q_c = 2\pi/4R_{comp}$), puisqu'une structure fractale ne peut être définie sur de plus petites tailles. La figure 5.8 présente le facteur de structure calculé avec $D_f = 2.1$. La polydispersité des rayons des complexes donnée dans la partie 5.2.1.2 a été prise en compte.

Finalement à partir du $P(q)$ précédemment ajusté et du $S(q)$ calculé le signal total de diffusion $I(q)$ peut être ajusté pour $q < 0.03 \text{ Å}^{-1}$. La représentation de l'ajustement est donnée dans la figure 5.1 pour les différents rapports de charge.

A partir de cette mesure il serait également possible d'estimer le nombre d'agrégation N_{agg} de complexes primaires impliqués dans les structures formées à plus grande échelle, si les distances sondées à petits q étaient plus grandes que la taille de l'agrégat. Dans ce cas, la diffusion ne serait alors plus dépendante de la dimension fractale et tendrait vers un régime de Guinier. L'intensité $I(q = 0)$ est proportionnelle au volume de l'agrégat $N_{agg}V_{comp}$. Puisque la taille caractéristique de l'agrégat est $R_{comp}N_{agg}^{1/D_f}$, le vecteur d'onde de coupure q_{c2} entre ce régime de Guinier et le régime où $I(q)$ diffuse en q^{-D_f} est $\frac{1}{R_{comp}N_{agg}^{1/D_f}}$ et l'on obtient :

$$I(q) = N_{agg}\phi_{lyso}\phi_{lyso-comp}\Delta\rho^2V_{comp}P_{comp}(q)\left(1 - \frac{q^2R_{agg}^2}{3}\right) \quad (5.12)$$

pour $q < q_{c2}$ avec $q_{c2} = \frac{1}{R_{comp}N_{agg}^{1/D_f}}$

ou Rg_{agg} est le rayon de giration de l'agrégat.

Pour $q > q_{c2}$, l'intensité est redonnée par les équations 5.6 et 5.11.

Sur les spectres de la figure 5.1, nous n'observons jamais de plateau dans le régime des très petits q , même pour les spectres de $[-]/[+]_{intro} = 1.66$ et $[-]/[+]_{intro} = 3.33$ (réalisés à l'ILL sur D22) pour lesquels le plus petit q sondé q_{min} est 0.0011 \AA^{-1} . La fenêtre de mesure ne nous permet donc pas de mesurer le nombre d'agrégation N_{agg} . Elle nous permet néanmoins de donner une valeur minimale de ce nombre. En effet, à partir des équations, il vient :

$$N_{agg} > S(q_{min}) \quad (5.13)$$

Nous obtenons $N_{agg} > 40$ pour $[-]/[+]_{intro} = 1.66$ et $N_{agg} > 42$ pour $[-]/[+]_{intro} = 3.33$. Les structures formées sont donc des agrégats impliquant au moins quelques dizaines de complexes primaires. Les tailles de ces structures étant trop grandes pour être mesurées grâce à la diffusion de neutrons, nous avons cherché et réussi à les obtenir par microscopie électronique comme expliqué dans ce chapitre en 5.5. Il sera notamment montré que le nombre d'agrégation est supérieur à la dizaine de complexes pour les deux rapports de charge introduits les plus faibles, ce que les mesures de DNPA, effectuées sur des gammes de q plus restreintes, ne permettent pas de montrer.

5.2.2 Signal des chaînes de PSS (Solvant D₂O/H₂O)

5.2.2.1 Protéine et polyélectrolyte : une même distribution spatiale au sein des globules ?

Comme vu dans le chapitre 3, les deux signaux de diffusion, celui de la protéine dans le solvant D₂O et celui des chaînes de PSS dans le solvant D₂O/H₂O, présentent les mêmes caractéristiques à petits q , ce qui prouve que les deux espèces sont distribuées à peu près de la même manière au sein des complexes. Nous allons vérifier cette hypothèse au cours du paragraphe suivant. D'après les équations 5.2 à 5.4, à l'échelle des complexes primaires, la diffusion du PSS s'écrit de la même manière que celle du lysozyme, c'est à dire comme dans l'équation 5.2. Les termes Φ_{comp} et V_{comp} sont identiques à ceux du signal du lysozyme. $(\rho_{PSS} - \rho_{solvant})^2$ dans le solvant 43%D₂O/57%H₂O est égal à $(\rho_{lyso} - \rho_{solvant})^2$ dans le solvant 100%D₂O pour des raisons de symétrie.

$$\Delta\rho_{comp}^2 = \Phi_{PSS_interne}^2 \Delta\rho^2 \quad (5.14)$$

où $\Phi_{PSS_interne}$ est la fraction volumique de chaînes de polymère dans le complexe.

Nous pouvons donc tester l'identité ou non de la répartition spatiale des espèces au sein de l'agrégat. Dans l'affirmative, nous pouvons considérer que $P_{comp}(q)$ et $S_{comp}(q)$ sont les mêmes dans le cas du PSS et celui du lysozyme et donc écrire à petits q :

$$I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q) = (\Phi_{PSS_interne}/\Phi_{lyso_interne})^2 \quad (5.15)$$

Dans ce cas, le rapport du signal de diffusion du PSS sur le signal du lysozyme devrait donc être une constante dans la région des petits vecteurs d'onde. C'est le cas effectivement sur la figure 5.9 pour $[-]/[+]_{intro} = 0.65$ et $[-]/[+]_{intro} = 1$. Par contre, pour $[-]/[+]_{intro} > 1$, le rapport augmente quand q tend vers zéro. La région où $I(q)$ augmente s'étend donc aux plus petits q ; la taille des agrégats de polymère est plus élevée. Il y a donc une sorte de couronne de polymère lorsqu'il y a un excès de charges négatives introduites.

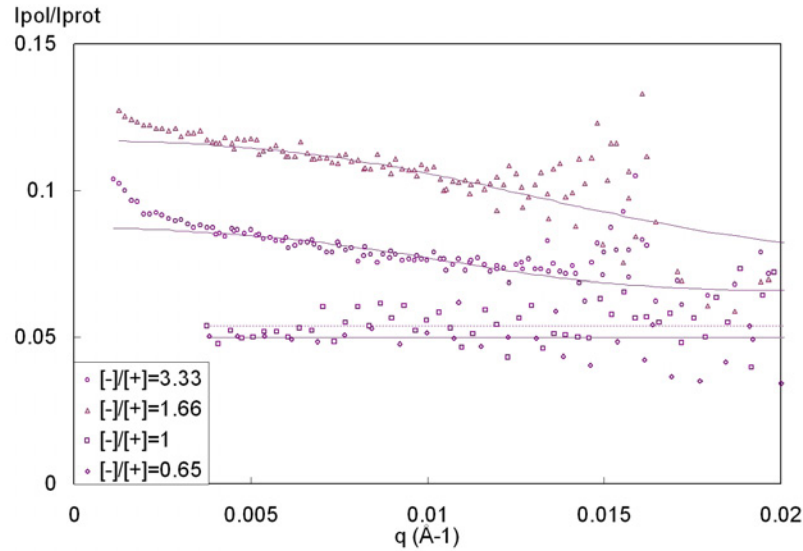


FIG. 5.9 – Rapport des signaux I_{pss}/I_{lyso} pour les quatre rapports de charge choisis

Nous allons maintenant discuter séparément des cas où les complexes possèdent ou non une couronne de polymère.

5.2.2.2 Rapport de charge interne et compacité : cas des globules sans couronne de polymère

Quand $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$ est constant, sa valeur permet un **accès direct au rapport des fractions volumiques internes** $\Phi_{PSS_interne}/\Phi_{lyso_interne}$ et par conséquent au rapport de charge interne. Nous obtenons :

- pour $[-]/[+]_{intro} = 0.65$: $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q) = 0.055$, soit $\Phi_{PSS_interne}/\Phi_{lyso_interne} = 0.23$ et $[-]/[+]_{interne} = 0.97$

- pour $[-]/[+]_{intro} = 1$: $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q) = 0.05$, soit $\Phi_{PSS_interne}/\Phi_{lyso_interne} = 0.22$ et $[-]/[+]_{interne} = 0.91$

Les rapports de charge internes dans les globules sont très proches alors que les rapports de charges introduits sont différents. De plus, ils sont très proches de 1. $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$ permet également d'obtenir la fraction volumique totale en matière au sein des complexes primaires $\Phi_{interne}$. En effet :

$$\Phi_{interne} = \Phi_{PSS_interne} + \Phi_{lyso_interne} = \Phi_{lyso_interne}(1 + \sqrt{(I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q))}) \quad (5.16)$$

ce qui donne :

$$\Phi_{interne} = 0.3 \quad \text{pour} \quad [-]/[+]_{intro} = 0.65$$

$$\Phi_{interne} = 0.24 \quad \text{pour} \quad [-]/[+]_{intro} = 1$$

Les complexes ont une très forte compacité puisqu'ils contiennent près de 30 % de matière alors que les fractions d'objets introduites ne sont que de quelques %.

Connaissant $\Phi_{PSS_interne}$, il est également possible de déterminer à partir des signaux de diffusion la quantité de PSS incluse dans les complexes Φ_{PSS_comp} . De même que pour le lysozyme, le signal de diffusion peut s'écrire :

$$I_{PSS}(q) = \Phi_{PSS_comp} \Phi_{PSS_interne} \Delta \rho^2 V_{comp} P_{comp}(q) S_{comp}(q) \quad (5.17)$$

En divisant Φ_{PSS_comp} par la quantité introduite dans l'échantillon, nous obtenons finalement le ratio de chaînes incluses dans les complexes $r_{PSS_comp} \approx 1$. La comparaison avec les données UV (voir 5.2) montre une bonne concordance. Toutes les valeurs sont données dans les tableaux suivants.

5.2.2.3 Cas des globules avec une couronne de polymère

Extension de l'analyse

Lorsque les agrégats apparaissent plus grands en contraste PSS, la situation reste remarquablement simple du fait :

- de la faible épaisseur supplémentaire en polymère : ceci est suggéré par la variation en q du rapport $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$, qui reste très douce, et est en accord avec l'image de chaînes courtes ancrées dans le coeur du globule où coexistent protéines et chaînes. Ces chaînes courtes ancrées devraient avoir une densité voisine de celles dans le coeur.

- de la symétrie sphérique des globules.

Finalement en contraste PSS,

- le globule apparaît comme une sphère homogène.

- la polydispersité doit donc être quasiment identique à celle trouvée pour les protéines.

- le facteur de structure inter-globules doit rester très proche.

Nous pouvons donc écrire dans tous les cas (si il y a des chaînes libres, leur signal est négligeable aux petits q) :

$$I_{PSS}(q) = \Phi_{comp_coeur-cour} \Phi_{PSS_interne}^2 \Delta \rho^2 V_{comp_coeur-cour} P_{comp_coeur-cour}(q) S_{comp}(q) \quad (5.18)$$

Où $\Phi_{comp_coeur-cour}$ est la fraction volumique de complexes avec une structure coeur-couronne, $V_{comp_coeur-cour}$ leur volume et $P_{comp_coeur-cour}(q)$ leur facteur de forme.

Nouvelles tailles

L'équation 5.18 permet la démarche suivante : pour mieux voir la différence entre les globules en contraste lysozyme et PSS, nous éliminons $S_{comp}(q)$ (obtenu en 5.2.1.3) par division. Les facteurs de forme sont présentés dans la figure 5.10 dans une représentation en $q^4 P(q)$. Toutes les courbes présentent un maximum caractéristique d'un rayon de sphère définie. Ce maximum est clairement déplacé vers les plus petites valeurs de q , c'est à dire vers les tailles plus grandes, pour le contraste PSS. Les valeurs de $R_{comp_coeur-cour}$ et $\sigma_{comp_coeur-cour}$ obtenues sont regroupés dans le tableau 5.4. Les ajustements par le facteur de forme de sphères polydisperses sont représentés dans la figure 5.10.

Les valeurs de $\Phi_{comp_coeur-cour} \Phi_{PSS_interne}^2$ peuvent être déduites des fits de la figure 5.10. $\Phi_{comp_coeur-cour}$ est lié à la fraction volumique de complexe trouvé dans le cas du lysozyme dans la partie 5.2.1.2. Suit la relation :

$$\Phi_{comp_coeur-cour} = \Phi_{comp}(V_{comp-coeur-cour-moyen}/V_{comp-moyen}) \quad (5.19)$$

Il est donc finalement possible d'obtenir la fraction volumique interne $\Phi_{PSS_interne}$ dans la structure coeur-couronne. Les valeurs sont données dans la table 5.4.

La fraction volumique de chaînes incluses dans les complexes peut également être obtenue :

$$\Phi_{comp_coeur-cour} = \Phi_{PSS_comp}/\Phi_{PSS_intra} \quad (5.20)$$

Cette relation nous donne la fraction de PSS complexée $r_{PSS-comp}$. Elle est égale à 1 quand $[-]/[+]_{intro} < 1.66$.

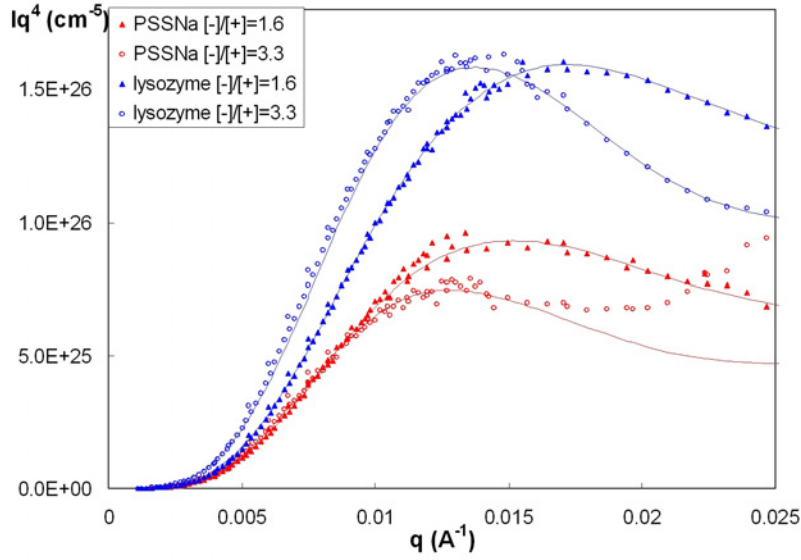


FIG. 5.10 – Facteurs de forme des complexes avec couronne de polymère pour le signal de lysozyme et de PSS en représentation $I(q)q^4 = f(q)$. Le signal de PSS est multiplié par 7 pour plus de clarté.

	r_{PSS_comp}	$\Phi_{PSS_interne}$	$R_{comp_coeur-cour}$	σ
$[-]/[+]_{intro} = 0.65$	≈ 1	0.052	73	0.45
$[-]/[+]_{intro} = 1$	≈ 1	0.041	73	0.45
$[-]/[+]_{intro} = 1.66$	≈ 1	0.069	154	0.35
$[-]/[+]_{intro} = 3.33$	0.43	0.075	164	0.31

TAB. 5.4 – Taille et teneur en PSS des complexes primaires coeur-couronne pour les quatre rapports de charge

Finalement la diffusion totale des chaînes de PSS peut être ajustée pour $q < 0.03\text{\AA}^{-1}$ et cet ajustement est représenté dans la figure 5.2 pour les différents rapports de charge.

5.2.3 Fraction volumique interne et rapport de charge des complexes primaires

Grâce aux valeurs de $\Phi_{PSS-intra}$ et $\Phi_{lyso-intra}$, il est possible de remonter au rapport de charge interne $[-]/[+]_{interne}$ et la fraction interne en matière des complexes Φ_{intra} . Toutes les valeurs sont reportées dans le tableau 5.5.

	$\Phi_{PSS-intra}/\Phi_{lyso-intra}$	Φ_{intra}	$[-]/[+]_{interne}$
$[-]/[+]_{intro} = 0.65$	0.235	0.29	0.97
$[-]/[+]_{intro} = 1$	0.22	0.24	0.91
$[-]/[+]_{intro} = 1.66$	0.25	0.34	1.03
$[-]/[+]_{intro} = 3.33$	0.25	0.375	1.03

TAB. 5.5 – Fraction volumique interne et rapport de charge interne des complexes primaires pour les quatre rapports de charge

En dépit des différences entre les valeurs de $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$ quand q tend vers zéro pour les différents échantillons, les valeurs de $\Phi_{PSS-intra}/\Phi_{lyso-intra}$ sont très proches pour tous les échantillons. Les différences sont dues à la présence de la couronne de polymère car en effet les différences de rayon induisent une augmentation de $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$. Finalement le calcul de $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$ à partir des ajustements suit parfaitement les valeurs expérimentales sauf à très petits q où un excès de diffusion peut être observé pour le PSS lorsque $[-]/[+]_{intro} > 1$. Cette remontée est sûrement due à des agrégats de chaînes libres comme vu classiquement sur des solutions de PSS pur⁷².

5.3 Complexes primaires

La figure 5.11 présentée ci-dessous donne une représentation schématique des structures formées telles qu'elles ont été déduites des différentes courbes de DNPA. Les structures ne sont cependant que des structures locales puisque la diffusion de neutrons ne permet pas de mesurer la taille finie des agrégats de complexe primaires. Pour rappel, ces structures sont très denses (de 25 à 40% de matière), leur rayon est constant pour $[-]/[+]_{intro} < 1$ et augmente une fois celui-ci dépassé. On observe également l'apparition d'une couronne de polymère quand $[-]/[+]_{intro} > 1$. Enfin, du fait de la stoechiométrie interne des complexes,

[72] Dubois, E.; Boue, F. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3684-3697.

des protéines libres sont présentes lorsque $[-]/[+]_{intro} < 1$ et des chaînes de polyélectrolyte libres sont présentes lorsque $[-]/[+]_{intro} \gg 1$.

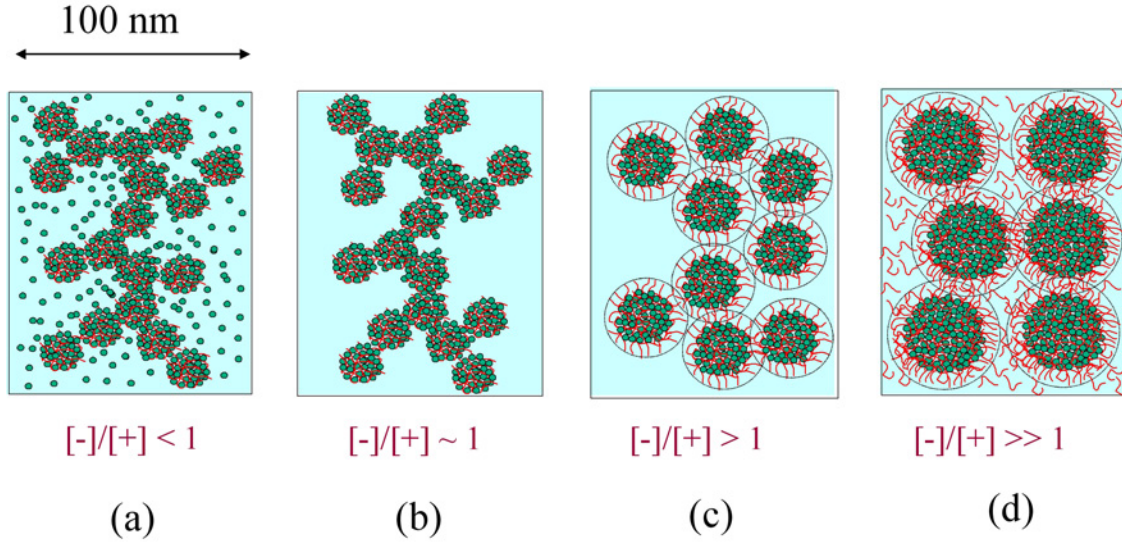


FIG. 5.11 – Représentation schématique des structures observées pour chacun des quatre rapports de charge

Le mécanisme principal de formation des globules au dépens de celle d'un gel semble être la contraction des chaînes de polyélectrolyte qui permet leur désinterpénétration. Nous avons vu dans le chapitre 3 par mesure directe de la conformation des chaînes que leur longueur de persistance était diminuée ce qui provoque une rétraction. Les interactions électrostatiques entre le lysozyme et les chaînes de polyélectrolyte sont très probablement le moteur de cette contraction.

Du fait du caractère stoechiométrique de la complexation au sein du globule, tous les objets en excès du point de vue des charges restent en solution hors des globules (comme vu dans la partie 5.1.2.2). Cependant la présence d'une couronne de polyélectrolyte pour un léger excès de charges négatives fait que l'apparition de chaînes libres n'a lieu que pour un large excès ($[-]/[+]_{intro} > 1.6$).

Cette stoechiométrie suggère que toutes les charges structurales participent à la complexation et pas seulement les charges effectives du polyion prévues par la condensation de Manning⁸³ (où la charge effective $Z_{eff} = Za/l_b$ avec a la distance entre deux charges et l_b la longueur de Bjerrum) qui dans notre cas donne une charge effective $Z_{eff} \approx Z/3$. Il est donc nécessaire que l'ensemble des contre-ions ne soient plus attachés au polyélectrolyte. Leur localisation sera discutée en 5.4.

[83] Manning, G. J. *Chem. Phys.* **1969**, 51, 924-938.

Un point frappant est la taille finie des globules. Cette taille augmente une fois $[-]/[+]_{intro} > 1$ mais la polydispersité de taille est très faible à un rapport donné. On peut imaginer que les complexes croissent d'abord individuellement en restant séparés par les répulsions électrostatiques jusqu'à atteindre une taille critique au delà de laquelle ils ne repoussent plus et s'agrègent en structure fractale. Nous avons en effet vu que les complexes, bien qu'étant quasi stoechiométriques au niveau du coeur, possèdent un léger excès de charge qui pourrait expliquer les répulsions initiales. Nous reviendrons sur ce point dans les chapitres 6 et 7.

5.4 Localisation des contre-ions

5.4.1 Concept de l'expérience

Nous avons émis l'hypothèse qu'une éjection des contre-ions a lieu pendant la formation des complexes denses. Cette hypothèse a été reprise et mesurée indirectement dans d'autres systèmes. Citons par exemple Ball et al.⁴² qui ont effectué des mesures de calorimétrie sur un système BSA-PAH et ont trouvé que l'association était endothermique ce qui prouve donc que cette réaction doit être régie par un gain d'entropie, gain qui ne peut venir que de la libération des contre-ions, les chaînes perdant de l'entropie en s'associant. Un autre exemple est donné par Rosenfeldt et al.⁸⁴ qui adsorbent des protéines sur des brosses de polyélectrolyte et qui expliquent également ce phénomène par une expulsion des contre-ions au profit des patchs positifs de la protéine.

Néanmoins aucune mesure directe n'a à notre connaissance été faite de cette expulsion des contre-ions. Afin de la vérifier nous avons effectué une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles pour mesurer le signal de ces contre-ions. Cette expérience est rendue possible par le fait que le lysozyme et le PSS hydrogéné ont exactement la même densité de longueur de diffusion. Cette caractéristique fait qu'il est possible de masquer les deux objets via un même mélange 43% D₂O / 57% H₂O et donc ainsi ne plus avoir que du signal venant des contre-ions (voir le schéma 5.12). Jusque là nous avons utilisé du PSS à contre-ion sodium et nous avons négligé la contribution des ions au signal total. En effet :

- dans le solvant 43% D₂O / 57% H₂O, la densité de longueur de diffusion du sodium est proche de celle du solvant et donc ne donne pratiquement aucun signal
- dans le solvant 100% D₂O le signal est très largement dominé par la protéine.

Donc afin d'avoir au contraire un maximum de signal venant de ces contre-ions, nous

[42] Ball, V.; Winterhalter, M.; Schwinte, P.; Lavalle, P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2357-2364.

[84] Rosenfeldt, S.; Wittemann, A.; Ballauff, M.; Breininger, E.; Bolze, J.; Dingenouts, N. *Physical review E* **2004**, *70*, 061403.

avons utilisé l'ion tétraméthylammonium deutérié (TAMd) $(CD_3)_4N^+$ qui possède 12 atomes de deutérium. Il possède ainsi un excellent contraste avec le solvant 43% D_2O / 57% H_2O qui masquera la protéine et le polyélectrolyte.

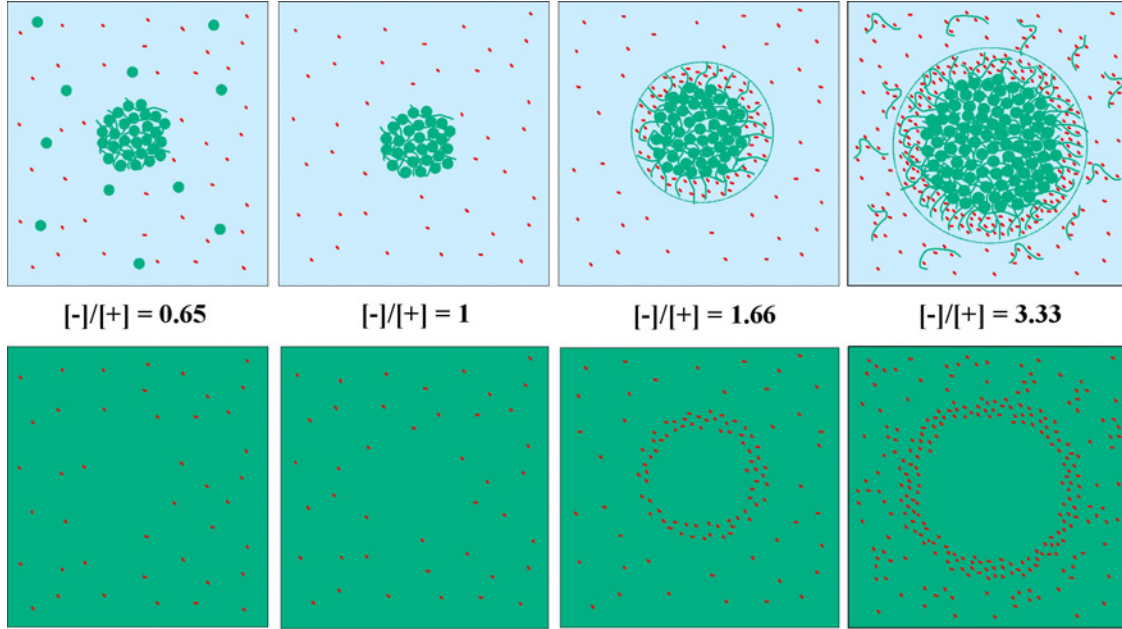


FIG. 5.12 – Schéma des contrastes observés dans le système à contre-ions TAMd si les contre-ions sont expulsés du coeur des complexes. Ligne supérieure : dans un solvant 100% H_2O . Ligne inférieure : dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O .

La figure 5.12 représente l'aspect des structures déterminées dans les chapitres précédents (Figure 5.11) en présence d'un tel marquage. Nous nous attendons à deux cas :

- un signal plat lorsqu'il n'y a pas de couronnes. Si par contre les contre-ions ne sont pas éjectés, alors nous devrions mesurer un signal équivalent à celui des chaînes deutériées dans les complexes, au contraste près.
- un signal de TAMd localisé dans les couronnes lorsqu'elles existent (rapports de charge introduits supérieurs à 1)

5.4.2 De Na^+ à TAM^+ : une même structure

Afin de vérifier que le système n'est pas modifié par le contre-ion TAM, nous avons tout d'abord mesuré des échantillons typiques avec du PSS deutérié et des contre-ions TAM hydrogénés (qui ne donnent donc pas ou peu de signal). Nous avons mesuré deux rapports de charge où les complexes sont censés avoir une couronne de polymère ($[-]/[+]_{intro} = 1.6$ et $[-]/[+]_{intro} = 3.3$). La figure 5.13 donne les signaux obtenus pour ces deux rapports de charge et pour les deux composés.

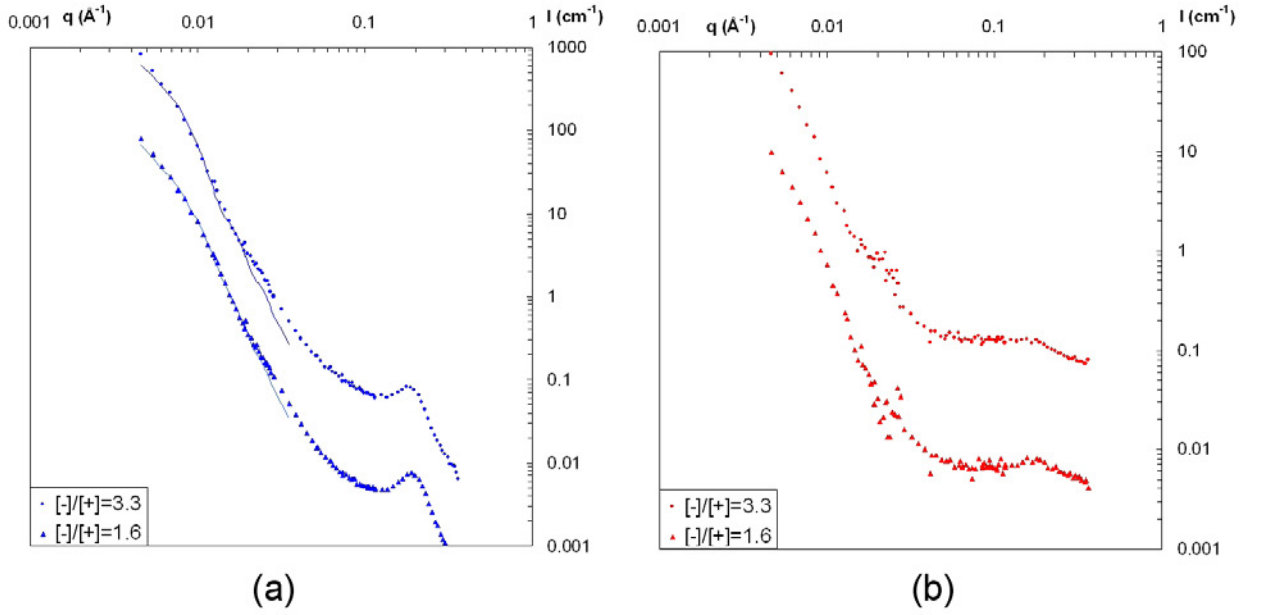


FIG. 5.13 – Courbes pour les rapports de charge introduits 1.6 et 3.3. (a) : signaux de protéine. (b) : signaux de polyélectrolyte. Les courbes sont représentées séparées d'un facteur 10

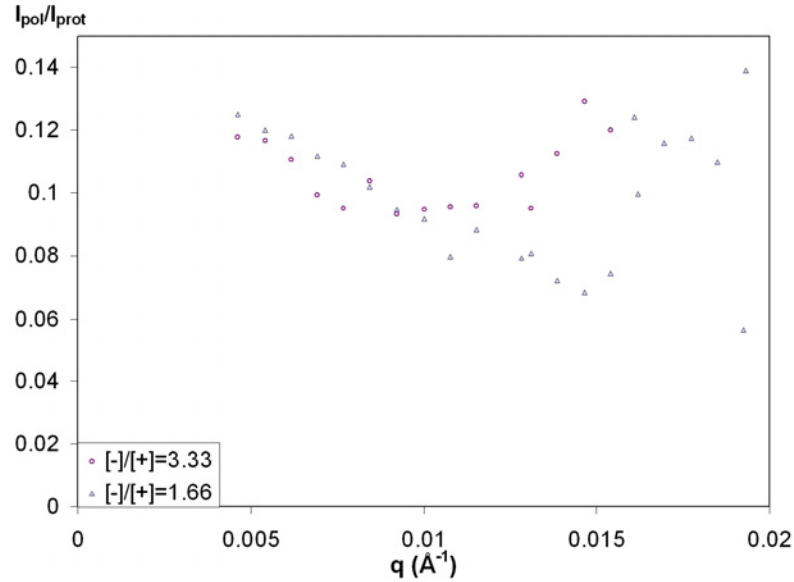


FIG. 5.14 – Rapport des signaux I_{pss}/I_{lyso} pour les complexes avec TAM hydrogéné et pour les deux rapports de charge choisis.

La première remarque est que les complexes primaires formés sont plus gros que ceux vus aux mêmes rapports de charge avec le PSSNa. Le rapport de charge 1.6 donne une taille de 190 Å avec un σ de 0.4 et le rapport de charge 3.3 donne une taille de 250 Å avec un σ de 0.4 également. Cependant de même que pour les échantillons avec le PSS, la différence entre les signaux de coeur et ceux de polyélectrolyte est évaluable à 50 à 60 Å, (le fait d'atteindre des tailles si grandes rend les spectres difficilement ajustables). Néanmoins les structures formées sont semblables à celles formées avec le PSSNa ce qui valide donc la mesure suivante effectuée avec le TAM deutérié. De plus la figure 5.14 montre que le rapport de charge interne est toujours proche de 1 puisque les valeurs de rapport d'intensité I_{PSS}/I_{lyso} sont les mêmes que pour les mêmes rapports de charge avec des chaînes de PSSNa (voir figure 5.9)

5.4.3 Globules sans couronnes : délocalisation des contre-ions

Nous avons donc ensuite mesuré le signal de quatre échantillons avec des contre-ions TAM deutériés. Nous avons choisi les quatres cas décrits en 5.3 correspondants aux quatres structures différentes. Si les contre-ions sont ejectés du coeur des complexes, ils seront dispersés dans le solvant et ne donneront donc aucun signal.

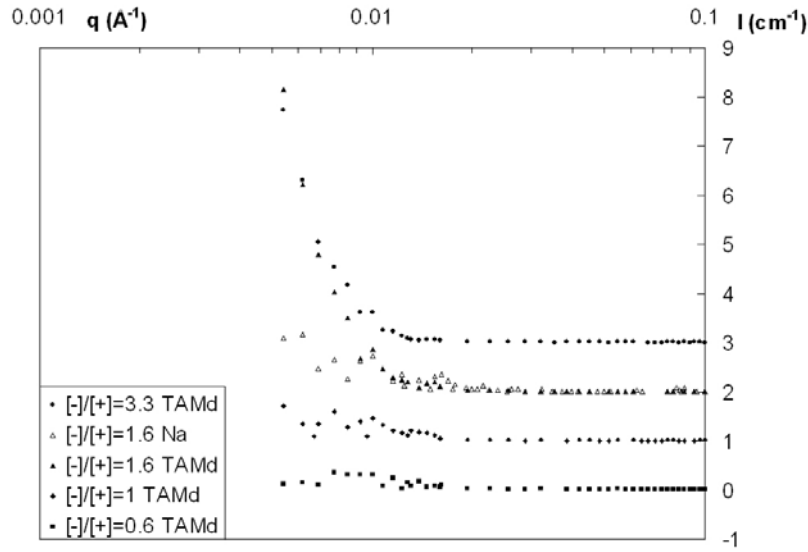


FIG. 5.15 – Courbes de diffusion des complexes à contre-ion TAM deutérié pour quatre rapports de charge et le témoin à contre-ion sodium. Les courbes sont toutes décalées d'un cm^{-1}

La figure 5.15 donne les signaux pour les quatre rapports de charge introduits choisis (0.6, 1, 1.6 et 3.3) plus un témoin de PSSNa à un rapport introduit de 1.6. On peut observer que jusqu'à une valeur de q de 0.02 Å^{-1} , les quatres échantillons ont un même signal qui est pratiquement plat. A partir de cette valeur on peut voir que les échantillons correspondant

aux rapports introduits 0.6 et 1 diffusent toujours aussi peu. **Ceci suggère que les contre-ions ont été éjectés du coeur des complexes et sont dispersés et solution.** Cependant il est plus qu'utile de comparer avec un cas où le signal n'est pas nul pour montrer que le fait de n'avoir pas de signal ne vient pas d'un manque de contraste du à une localisation trop diffuse. Cette possibilité nous est apportée par les rapports de charge 1.6 et 3.33.

5.4.4 Globules avec couronnes : localisation des contre-ions et ajustement du signal

A l'inverse du cas précédent, les échantillons des rapports 1.6 et 3.3 présentent une très forte diffusion. L'échantillon témoin à contre-ions Na donne un très faible signal de diffusion à très petits q . La diffusion à très petits q des échantillons 1.6 et 3.33 avec des contre-ions TAMd est donc due à ces seuls contre-ions.

Etant donné que les échantillons aux rapports de charge introduits de 1.6 et 3.3 sont ceux possédant une couronne de polymère, les diffusions observées sont donc probablement dues à ces couronnes dans lesquelles les contre-ions sont condensés aux chaînes de PSS. Et donc il en découle que la diffusion venant du polyélectrolyte montrée dans la figure 5.13 doit être similaire à celle observée ici à un facteur de contraste près. C'est ce qui est montré dans la figure 5.16 où les deux signaux sont comparés.

La diffusion des contre-ions TAMd est difficile à ajuster au premier abord du fait de la statistique de comptage assez pauvre. En effet, nous avons dans ce cas un faible contraste effectif dû à la faible fraction volumique en contre-ions sur les chaînes. A cela vient s'ajouter le fait que la gamme de q utilisée corresponde à une grande distance et une grande longueur d'onde ce qui minimise le flux de neutrons incident.

Plutôt qu'un ajustement par un modèle numérique, il semble plus approprié de mesurer le rapport entre le signal des contre-ions et celui des chaînes deutériées dans un échantillon équivalent. On constate que les courbes se superposent après application d'un facteur multiplicatif ce qui prouve que $P(q)$ et $S(q)$ sont identiques dans les deux cas. Les facteurs de normalisation trouvés avec une précision raisonnable (car déterminés sur l'ensemble de la courbe) sont respectivement 0.09 et 0.08 pour les rapports 1.6 et 3.33.

Un calcul rapide permet d'estimer l'ordre de grandeur de ce facteur. En considérant qu'un tiers de contre-ions sont condensés comme prévu par Manning, et comme la densité de longueur de diffusion du TAMd est proche de celle des chaînes deutériées, le rapport théorique est donc de $(1/3)^2$ soit 0.1. On retrouve donc quasiment ce facteur.

On remarquera que les courbes se superposent parfaitement sur une gamme de q allant jusqu'à 0.02 \AA^{-1} environ ce qui démontre que les contre-ions TAM sont bien condensés sur

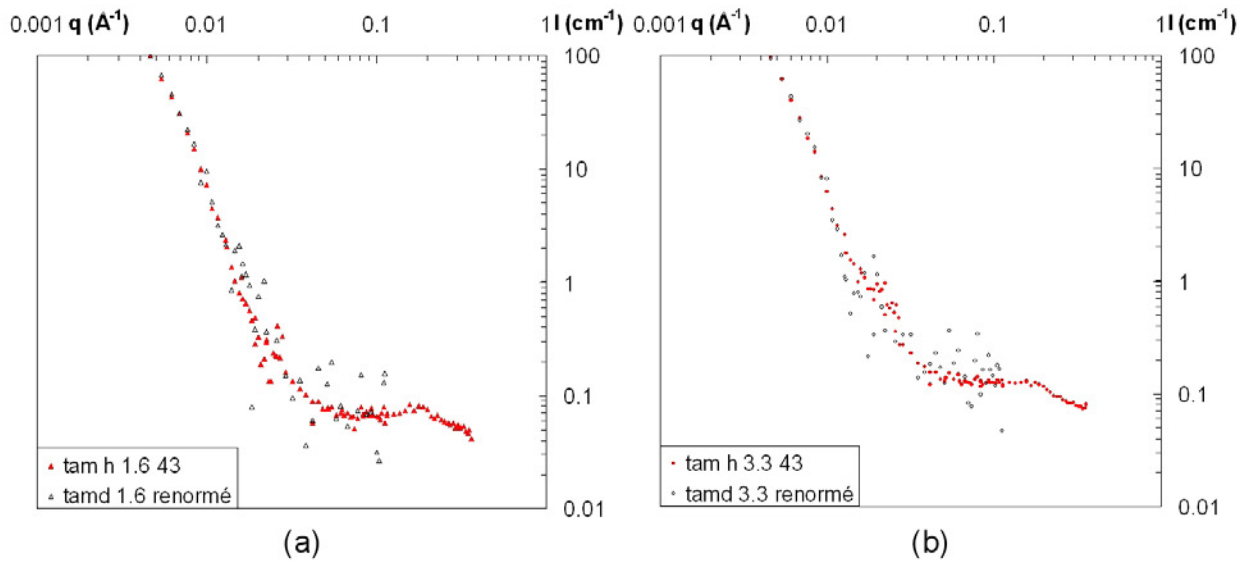


FIG. 5.16 – Courbes de diffusion des complexes à contre-ion TAMd comparés à leur correspondant en PSSNa deutérié pour deux rapports de charge. Les courbes à contre-ions TAM sont renormalisées au niveau des diffusions des chaînes de PSSNa deutérié

les chaînes de PSS qui dépassent des complexes. De même le fait de n'avoir quasiment aucun signal venant des échantillons pour les rapports de charge introduits de 0.6 et 1 confirme l'hypothèse que les contre-ions sont éjectés lors de la formation des complexes primaires. C'est à notre connaissance la première fois que ce phénomène est directement mesuré.

5.5 Structure à grande échelle

Les complexes primaires sont agrégés à plus grande échelle. De la dimension fractale obtenue par DNPA on peut imaginer qu'il y a agrégation entre globules déjà formés. Mais des informations à plus grande échelle seraient utiles pour appréhender les conditions d'agrégation. La forte turbidité des échantillons ne permettant pas d'effectuer des expériences de diffusion de lumière, nous avons effectué des expériences de microscopie électronique à transmission après cryofracture pour révéler les structures. La technique est très adaptée car elle permet de faire de la microscopie sans étape de séchage. Les mesures ont été effectuées par Jean-Marc Verbavatz du laboratoire LTMD (CEA Saclay).

5.5.1 Cryo-TEM

5.5.1.1 Principe et mode opératoire

Le principe de la cryofracture est de congeler une solution puis de couper l'échantillon en deux et d'observer les aspérités qui correspondent aux objets présents en solution.

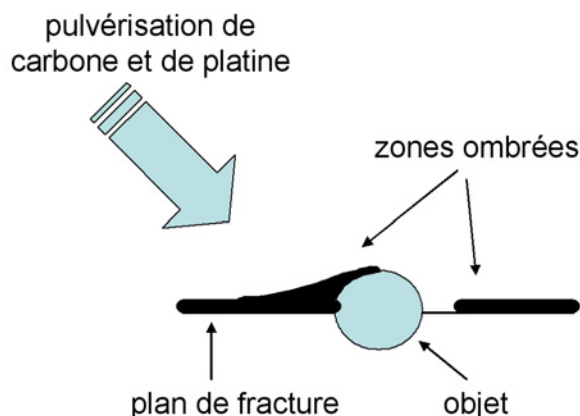


FIG. 5.17 – Schéma de principe de création de la réplique

Pour cela nous avons tout d'abord préparé des échantillons de façon similaire à ceux utilisés pour les études DNPA à la différence que ceux-ci contiennent 20% en masse de glycerol ceci afin d'empêcher la formation de glace cristalline lors de la congélation. Une goutte de l'échantillon ainsi préparé est ensuite placée entre deux plaques en inox et plongée dans un bain d'azote liquide pour la congeler instantanément. Les plaques contenant la goutte congelée sont placées dans une enceinte sous vide et ces plaques sont ensuite ouvertes en un temps très bref ce qui force à la goutte congelée à se couper en deux. Le plan de fracture est une surface plus ou moins rugueuse suivant la présence ou non de gros objets à l'interface (voir schéma). Cette surface est ensuite recouverte d'une couche de carbone déposée par pulvérisation puis d'une couche de platine. On sépare alors la double couche de la partie en masse ce qui crée une réplique de la surface (à laquelle peut rester accrochée une partie de l'échantillon en masse). C'est cette réplique qui est ensuite passée au microscope électronique à transmission afin de caractériser l'échantillon.

Il est à noter que cette technique est très utilisée pour caractériser des objets interfaciaux car dans ce cas ils sont présents à la surface de la fracture. Dans notre cas les objets étant dispersés en solution, ils sont tout autant susceptibles de se retrouver à la surface que dans le bulk, c'est pourquoi la taille maximale mesurée sur l'image obtenue correspondra au diamètre des objets. Si ces objets dépassent de plus de la moitié, ils se retrouveront sur la deuxième surface créée pendant la fracture.

Par ailleurs les agrégats que nous nous attendons à voir étant tridimensionnels, il est

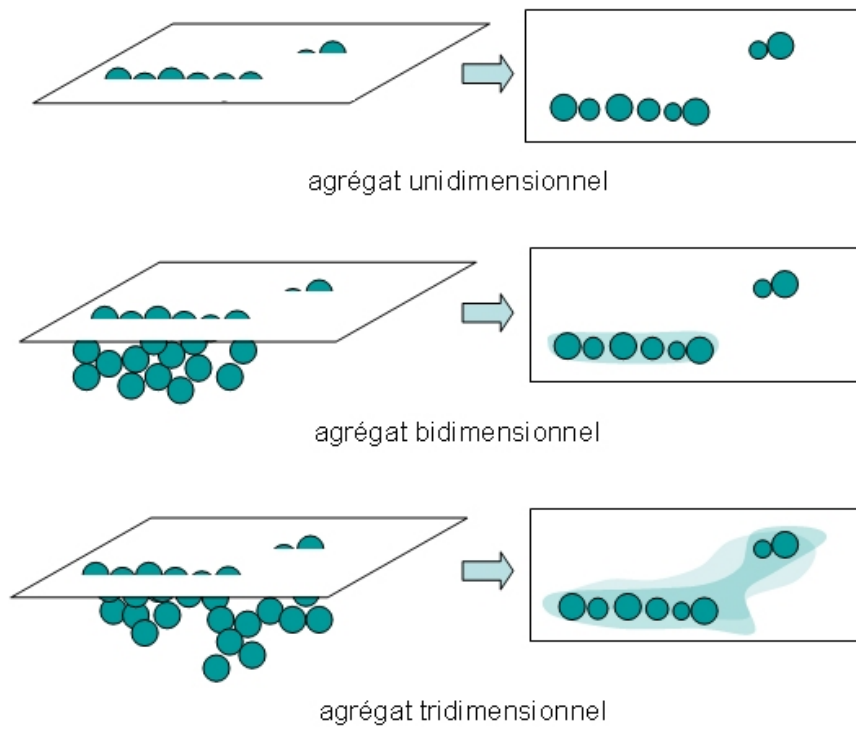


FIG. 5.18 – Schémas des différentes figures qu'il est possible d'observer en fonction de la dimension des agrégats formés sous la surface de fracture

possible qu'ils continuent sous la surface et donc dans ce cas ils pourront créer des zones d'ombre sous les objets vus à la surface, dans la petite partie de l'échantillon qui reste accrochée à la réplique lorsque celle-ci est séparée de l'échantillon. De plus même si elle ne possède pas la densité électronique de ces deux composés, la présence de complexes très denses (contenant notamment des atomes de soufre) suffit à créer une absorption électronique qui induit donc des zones d'ombre sur les clichés. Le schéma 5.18 présente les cas qu'il est possible d'obtenir si les objets à la surface font partie d'un ensemble unidimensionnel, bidimensionnel ou tridimensionnel. On peut y voir représentées les zones d'ombre induites par la présence de complexes sous la surface de fracture. L'observation des clichés de TEM-cryofracture va donc nous dire si nous avons bien cette structure tridimensionnelle attendue.

5.5.1.2 Résultats

Les clichés de cryofracture suivants ont été effectués sur des échantillons préparés à partir des mêmes produits que ceux utilisés pour les mesures de DNPA. La seule différence a consisté en l'apport de 20% en masse de glycérol pour éviter la cristallisation comme dit plus tôt. Pour être sûr que la présence de glycérol n'influe pas sur le système, un tel échantillon a également été vérifié en DNPA pour $[-]/[+]_{intro} > 1$ et la mesure a montré que les objets formés sont très peu différents (voir figure 5.19).

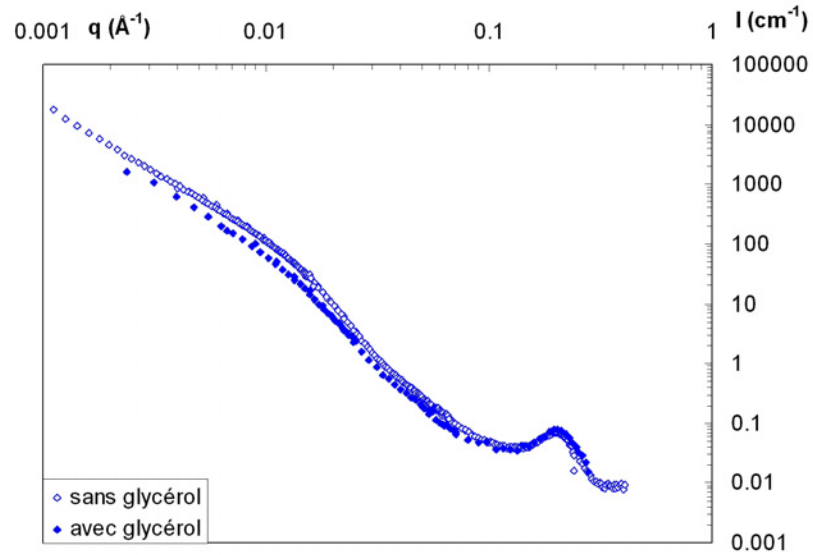


FIG. 5.19 – Signal de protéine de l'échantillon dans le solvant utilisé pour la cryofracture comparé à son équivalent en solvant standard

Nous avons donc ainsi pu observer les échantillons à des échelles allant de la taille des complexes primaires ($\approx 100 \text{ \AA}$) jusqu'à une échelle de l'ordre du μm .

Il apparaît sur l'ensemble des clichés des structures formées d'objets de taille finie. Ces objets présentent une partie noire et une partie blanche alors que les parties sans objets sont grisées. De plus, l'orientation de la partie noire est toujours la même au sein d'un même cliché. Ceci est lié à la pulvérisation du platine lors de la création de la réplique (Fig 5.17). Par ailleurs, si les clichés ne représentent qu'une partie très faible de la réplique, des observations rapides en TEM montrent que les structures présentées sur les figures 5.20 à 5.22 se retrouvent sur l'ensemble de toute la réplique (≈ 2 mm). Il n'y a donc pas démixtion microscopique de l'échantillon. Une première remarque est que **la structure formée à grande échelle est la même pour tous les rapports de charge introduits** (nous avons testé les rapports 0.5 , 1 et 1.66). **Ces résultats sont cohérents avec les mesures de diffusion de neutrons** des parties 1 et 2. La technique n'est en effet pas assez sensible pour détecter des objets aussi petits que les lysozymes libres en solution ou les chaînes libres de PSS. Rappelons que l'exposant fractal 2.1 est observé par DNPA pour l'agrégation des différents complexes primaires qu'ils possèdent ou non une couronne de polymère.

Ces clichés donnent des informations à plusieurs échelles.

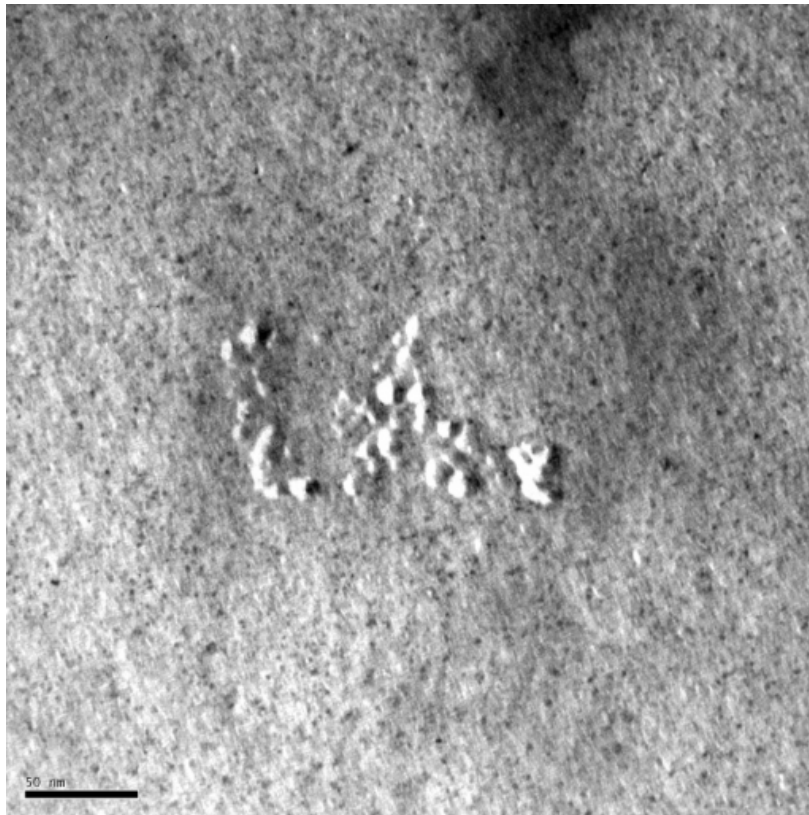


FIG. 5.20 – Clichés de TEM après cryofracture pour l'échantillon à rapport de charge introduit égal à 1.6, échelle locale.

Sur des échelles locales (fig 5.20), il est possible de bien observer les complexes primaires. Les objets ont tous des tailles caractéristiques très similaires sur l'image. Il faut garder à l'esprit que la taille des objets apparaît avec une polydispersité apparente sur les clichés de cryofracture de par le principe même de la mesure. En effet, puisque seule la partie émergente des objets est observée, leur taille apparente dépend de leur profondeur par rapport à la surface de fracture. Si on tient compte de cet effet, les complexes primaires observés par la cryofracture sont donc assez monodisperses. **La taille maximale mesurée (15 à 20 nm), donc le diamètre, correspond à la taille déterminée par la diffusion de neutrons.**

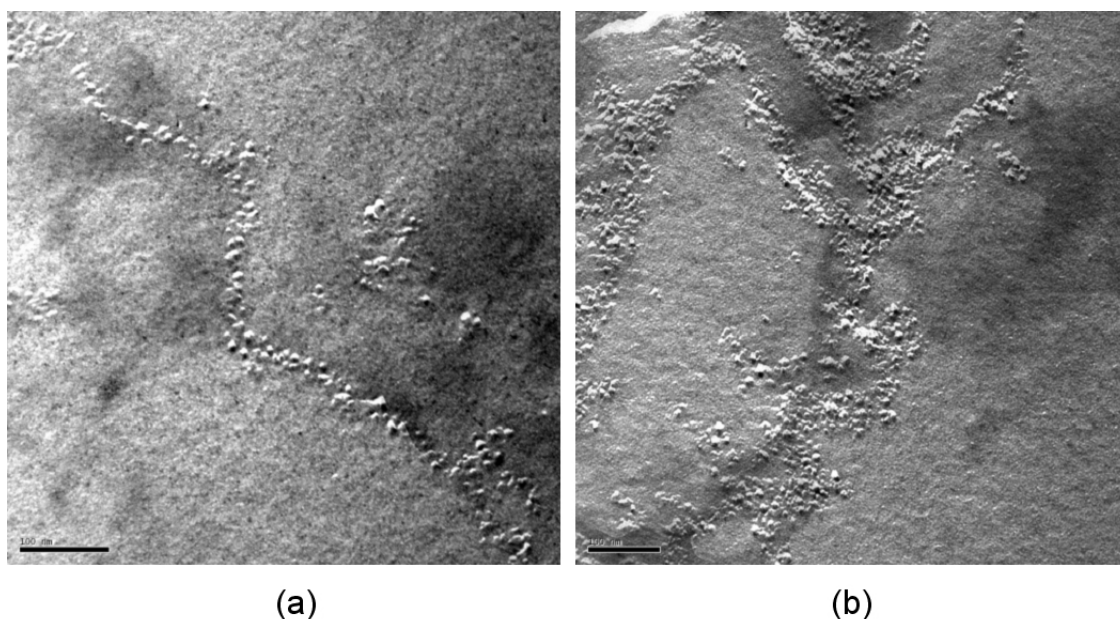


FIG. 5.21 – Clichés de TEM après cryofracture pour l'échantillon à rapport de charge introduit égal à 1.6, échelle intermédiaire (côté du carré $\approx 0.5 \mu\text{m}$).

Sur des échelles intermédiaires (fig 5.21) il apparaît que les complexes primaires forment des agrégats à des tailles supérieures, supérieures au micron. Les figures 5.21 (a) et 5.21 (b) présentent néanmoins des différences importantes. Bien que les complexes primaires soient de même taille sur les deux images, les agrégats apparaissent comme des zones denses sur la première image alors qu'ils ont une structure filiforme avec une faible largeur (de 2 à 5 complexes primaires de largeur) sur la seconde. Il n'est cependant pas possible que des "fils" de complexes denses soient formés en volume car la densité de complexes obtenue alors serait beaucoup trop faible par rapport à la densité de complexes solvatés en solution ($\phi_{comp} \approx 8 \%$ d'après les résultats de DNPA). Ceci est confirmé par le fait que des zones d'ombre sont situées sous la surface des complexes. Puisque les deux images représentent une même structure, il est probable que les structures formées soient proches de plans s'entrecroisant

dans l'espace. Lorsque le plan de coupe lors de la réalisation de la fracture est perpendiculaire à un plan de complexes, il n'apparaît au final qu'un objet 1D sur le cliché. Lorsque le plan de coupe lors de la fracture est parallèle à la surface, il apparaît sur les clichés les zones très denses de la figure 5.21 (a).

Les zones denses sont très hétérogènes en nombre de complexes puisqu'elles peuvent impliquer de quelques complexes jusqu'à quelques dizaines de complexes, ce qui confirme que les agrégats de complexes primaires sont organisés à plusieurs échelles. Finalement, l'exposant typique de diffusion des agrégats de complexes primaires de 2.1 obtenu en diffusion de neutrons est cohérent avec le caractère multiéchelle des agrégats de complexes primaires imagées. De plus, les structures caractéristiques d'organisation des complexes primaires dans les zones denses à l'échelle d'une centaine de nm sont similaires à celles que nous avons schématisées sur la figure 5.11 à partir des spectres de DNPA. Le nombre de complexes primaires impliqués dans la structure de la figure 5.21 (a) est de quelques centaines de complexes primaires, ce qui est cohérent avec les mesures de DNPA qui ont montré que le nombre d'agrégation N_{agg} est supérieur à 40.

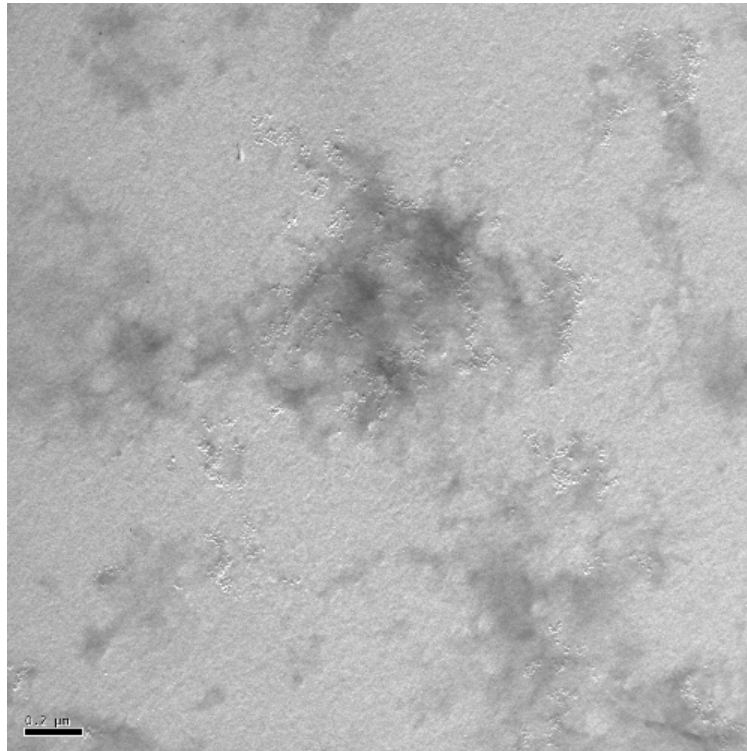


FIG. 5.22 – Cliché de TEM après cryofracture pour l'échantillon à rapport de charge introduit égal à 1.6, échelle large (côté du carré $\approx 2 \mu\text{m}$).

Enfin sur de grandes échelles spatiales, les clichés font essentiellement apparaître les zones d'ombre et donnent une image de l'organisation à grande échelle des agrégats de

complexes primaires. Ceux-ci ont toujours des structures très digitées qui confirme le caractère fractal de l'agrégation. Un zoom sur les quelques parties émergées des zones d'ombres fait à nouveau apparaître soit des zones denses, soit des zones filaires en globules, ce qui confirme que les figures 5.21 (a) et 5.21 (b) sont bien issues de la même structure fractale. De même l'agrégat de la figure 5.20, et qui apparaît isolé, doit être l'extrémité d'un "doigt" de la structure fractale.

Pour ce qui est du nombre d'agrégation, la très grande dimension des agrégats et leur variété ne permet pas de l'évaluer. Cette grandeur n'est pas vraiment appropriée à la description de la structure. Il est d'ailleurs possible que les structures à grandes échelles évoluent au cours du temps et que des réorganisations locales apparaissent.

5.5.2 Discussion sur l'agrégation à grande échelle (inter globule)

Les complexes primaires forment donc des agrégats de complexes primaires dont la dimension fractale est 2.1. Cette dimension fractale est caractéristique de l'agrégation limitée par la réaction (Reaction Limited Colloidal Aggregation)⁷⁹. Ce mécanisme d'agrégation a comme facteur principal la réaction chimique entre les composés qui s'agrègent à la différence de l'agrégation limitée par la diffusion (Diffusion Limited Colloidal Aggregation DLCA) qui a comme moteur principal la diffusion des objets et aboutit à des dimensions fractales plus faibles⁸⁰. L'agrégation de type RLCA a souvent été observé sur divers systèmes expérimentaux^{79,85,86}). Nous présentons sur la figure 5.23 une image d'agrégats de colloïdes d'or créés par RLCA⁸⁷. Cette image a été obtenue par microscopie électronique sans cryo-fracture préalable et la superposition des billes au centre de l'agrégat donne un aspect très dense à l'agrégat. Cependant si on s'intéresse à la périphérie de l'agrégat ou le signal est lié à une ou deux couches de colloïdes, la structure obtenue est très proche de la figure 5.21 (a).

Les systèmes colloïdaux stabilisés électrostatiquement permettent souvent l'agrégation de type RLCA. En effet dans de tels systèmes, la barrière énergétique à franchir pour agréger deux colloïdes peut être élevée, de l'ordre de quelques kT. Le temps nécessaire en moyenne pour la franchir devient très supérieur aux durées de diffusion et beaucoup de pré-contacts entre objets sont sans effet. Les objets peuvent pénétrer alors profondément dans la structure et la dimension fractale est plus élevée. Il est d'ailleurs possible de passer d'un processus RLCA à un processus DLCA par simple écrantage des interactions⁸⁷. Dans nos systèmes, les complexes possèdent un léger excès de charges positives si les protéines introduites sont en excès et un léger excès de charges négatives si les chaînes de PSS introduites sont en

[85] Fenistein, D.; Barré, L.; Broseta, D.; Espinat, D.; Livet, A.; Roux, J.-N.; Scarsella, M. *Langmuir* **1998**, *14*, 1013-1020.

[86] Kallala, M.; Jullien, R.; Cabane, B. *J. Phys. II France* **1992**, *2*, 7-25.

[87] Weitz, D.; Huang, J.; Lin, M.; Sung, J. *Physical review letters* **1985**, *54*, 1416-1419.



FIG. 5.23 – Image de microscopie électronique d’un agrégat de colloïdes d’or créé par RLCA (tirée de Weitz et al.)

excès (cf Tab 5.5). Cet excès de charge peut donc induire des répulsions électrostatiques entre complexes permettant l’agrégation RLCA. Il doit cependant rester quelques charges opposées à la surface des complexe primaires afin de permettre leur agrégation car sinon les répulsions électrostatiques devraient stabiliser le système à l’échelle des complexes primaires.

5.6 Résumé

L’objet central de ce chapitre était de montrer, dans le cas d’une structure en globules denses, comment et jusqu’à quel niveau l’analyse des spectres DNPA peut être poussée. La mise en place d’une méthode de traitement des données associée à des dosages UV a permis de déterminer la taille des complexes, leur composition interne exacte de chacun des composés (protéine, polyélectrolyte, eau) et donc à partir de là leur compacité et leur rapport de charge interne. Les possibilités de marquage isotopique ont permis une mesure en deux temps, protéine d’abord puis polyélectrolyte, pour déterminer une première taille puis ces compositions et enfin de déterminer si les complexes possèdent ou non une couronne de polyélectrolyte.

A l’issue de cette première partie technique, il apparaît des données physiques très nettes. Le rapport de charge interne reste toujours proche de 1 et les espèces en excès restent à l’extérieur des complexes. Elles sont libres en solution dans le cas de protéines. Dans le cas des chaînes de PSS, les espèces sont présentes dans une couronne autour des coeurs de

complexes. Lorsque les couronnes sont saturées en chaînes, l'excès de chaînes se retrouve libre en solution.

Ces valeurs de fraction volumique et de rapport de charge interne suggeraient qu'un des moteurs de la complexation est le relarguage des contre-ions hors du coeur des complexes. Grâce aux techniques de marquage DNPA, nous avons pu le vérifier expérimentalement. C'est à notre connaissance la première fois que ce phénomène est directement mesuré.

La dernière information concerne l'agrégation des complexes primaires formés à une échelle supérieure en structures fractales de dimension 2.1 ; cette agrégation continue jusqu'à des tailles de plusieurs microns, comme observé grâce aux clichés de TEM. Cette agrégation est de type RLCA.

Maintenant que le canevas d'analyse et les paramètres caractéristiques sont donnés, le chapitre suivant sera consacré à la généralisation de cette étude sur les complexes denses. Nous déterminerons en particulier les effets de variation de densité de charge sur les objets (via le pH et le taux de charge du polyélectrolyte) ainsi que les effets de concentration en matière introduite sur la taille des complexes.

Chapitre 6

Régime de globules denses (2) : les interactions électrostatiques comme pilote de la structure

Ce chapitre est consacré à la suite de l'étude des complexes formés lorsque la concentration en chaînes est en régime dilué décrite au chapitre 5. Nous avons montré dans ce dernier chapitre sur 4 échantillons caractéristiques comment, à partir de l'analyse des courbes de DNPA et de la mesure des espèces libres par spectroscopie UV, il est possible de déterminer la taille, la compacité et le rapport de charge interne des primaires formés. Nous avons notamment montré que le rapport de charge interne est très proche de 1, quel que soit le rapport de charge introduit. Nous allons dans ce chapitre étendre cette étude en déterminant de façon systématique l'influence de différents paramètres (taux de charge et concentrations des espèces introduites) sur les caractéristiques des complexes denses formés. Nous chercherons à voir si la stoechiométrie au coeur des complexes est retrouvée lorsque le pH est changé (ce qui permet de fixer le nombre de charges sur la protéine) et lorsque le taux de charge f des chaînes de PSS est changé. De plus nous déterminerons les effets de concentration sur la taille des complexes. La concentration du tampon (50 mM) ne sera pas variée dans ce chapitre. Nous discuterons ensuite de la composition interne des complexes, des tailles de complexe et de la compacité dans les paragraphes 6.2, 6.3 et 6.4 respectivement. Nous montrerons finalement comment les interactions électrostatiques entre agrégats peuvent moduler la taille finie des complexes denses.

6.1 Variation de la densité de charge sur les objets : résultats de DNPA

Dans un premier temps nous avons déterminé l'effet d'un changement de densité de charges sur les objets. Il est possible de la faire varier sur le polyélectrolyte via son taux de charge ainsi que sur la protéine via le pH. Le but est de déterminer si les tailles et compositions internes obtenues sont uniquement fonction des rapports de charge introduits ou si un changement de densité de charge (et donc de la quantité de produit à introduire) fait varier ces résultats. Nous présentons dans ce paragraphe tous les résultats issus des ajustements des différentes courbes de DNPA.

6.1.1 Variation de la densité de charges sur la protéine : variation du pH

Intéressons-nous tout d'abord à la variation de densité de charges sur la protéine. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les charges sur la protéine sont fonctions du pH puisque les charges viennent des groupement acides et basiques sur les acides aminés. Nous avons jusqu'ici travaillé à un pH de 4.7, pH auquel la protéine porte une charge nette positive de +11. Nous allons ici faire varier ce pH afin d'augmenter et de baisser la densité de charges sur la protéine. Les pH choisis sont 3 et 7 ce qui permet à la protéine de porter 17 et 8 charges respectivement. Les rapports de charge introduits choisis sont compris entre 0.5 et 3, les résultats seront comparés à ceux du pH 4.7 dont la partie déjà présentée dans le chapitre 4 sera complétée ici. De façon générale l'intérêt sera centré autour du rapport de charge introduit 1.

6.1.1.1 Globules à pH 3

La figure 6.1 représente les signaux de DNPA obtenus pour le pH 3 à six rapports de charge introduits compris entre 0.5 et 2.5. Il faut noter que les courbes des rapports de charge introduit inférieurs à 1 sont représentées également soustraites du signal de protéine libre comme cela a été expliqué dans le chapitre 4 afin de faciliter l'ajustement et de pouvoir observer le pic de corrélation de la protéine.

Nous voyons que les caractéristiques générales des courbes de diffusion des globules denses détaillées dans le chapitre 5 sont retrouvées pour tous les rapports de charge introduits, que ce soit pour le signal de la protéine ou pour celui du polyélectrolyte. Nous allons ici les résumer de nouveau.

Pour la protéine, la diffusion à grands q est en q^{-4} , signal de la protéine native à cette

échelle. Un pic de corrélation est ensuite observé à 0.2 \AA^{-1} , il est dû à une distance privilégiée entre les protéines qui est de 31 \AA dans l'espace réel soit exactement un diamètre de protéine. Ceci démontre que les protéines sont en contact au sein des complexes denses. On observe ensuite à q intermédiaires à nouveau une diffusion en q^{-4} due aux globules denses (les complexes primaires) puis enfin une diffusion en $q^{-2.1}$ due à l'organisation à plus grande échelle de ceux-ci.

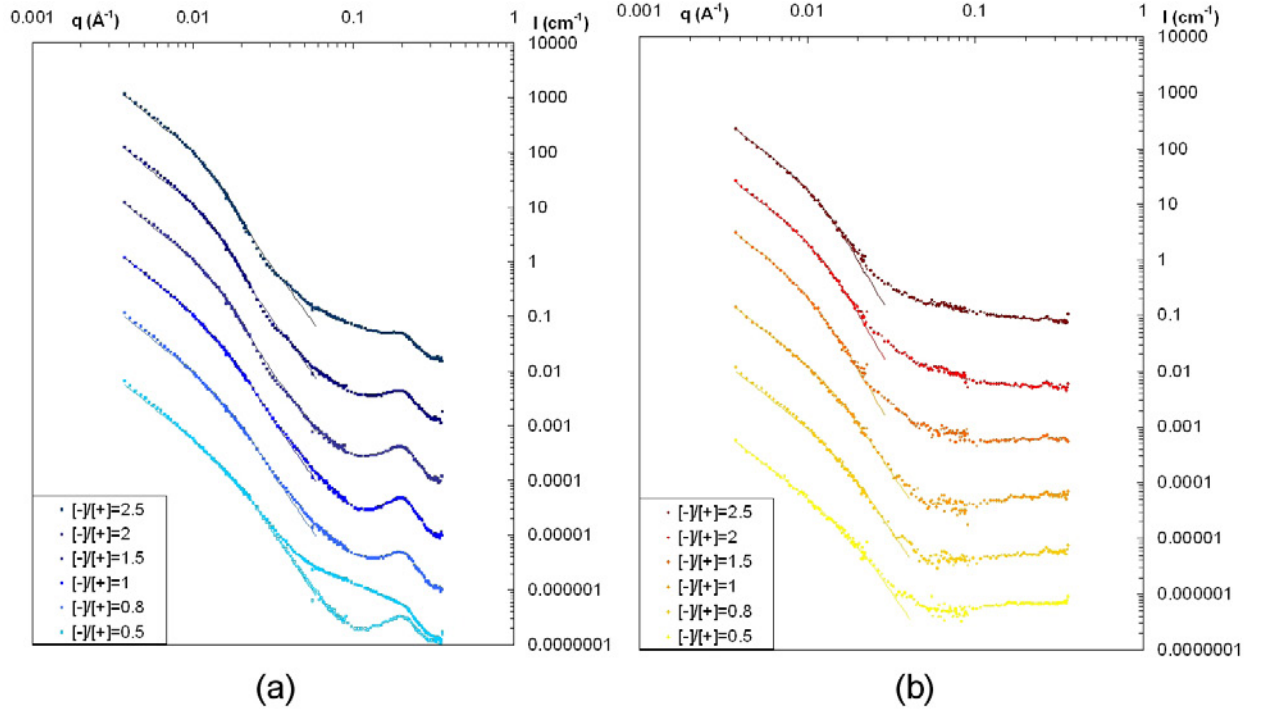


FIG. 6.1 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit pour $\text{pH} = 3$ ainsi que leurs ajustements à petits q . (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les six rapports de charge décalées d'un facteur 10. La courbe du rapport 0.5 est représentée avec et sans soustraction du signal de lysozyme libre. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les six rapports de charge séparées d'un facteur 10.

Pour le polyélectrolyte, la diffusion observée est également proche de celle du $\text{pH} 4.7$. La seule différence est à grands q où la réminiscence du pic de corrélation de la protéine à 0.2 \AA^{-1} n'est plus observée. Par contre à moyens et petits q les caractéristiques des complexes primaires sont retrouvées, à savoir la décroissance en q^{-4} due à leur forme puis la décroissance en $q^{-2.1}$ due à leur structure.

Nous avons vu dans le chapitre 4 que l'analyse des courbes permet d'obtenir la taille ainsi que la composition interne des complexes primaires. Le tableau 6.1 répertorie ces valeurs déduites à partir des ajustements pour les six rapports de charge mesurés.

	R_{prot}	R_{pol}	σ	Φ_{prot}	Φ_{pol}	$[-]/[+]_{interne}$
$[-]/[+] = 0.5$	70	70	0.45	0.29	0.085	0.87
$[-]/[+] = 0.8$	85	85	0.45	0.24	0.077	0.91
$[-]/[+] = 1$	95	95	0.45	0.27	0.08	0.88
$[-]/[+] = 1.5$	132	158	0.35	0.25	0.083	0.97
$[-]/[+] = 2$	145	155	0.31	0.25	0.093	1.11
$[-]/[+] = 2.5$	150	155	0.32	0.23	0.091	1.2

TAB. 6.1 – Taille, composition interne et rapport de charge interne pour les six rapports de charge étudiés pour le pH 3

On observe beaucoup d’analogie avec les données déjà présentées pour le pH 4.7 :

- le rapport de charge interne reste proche de 1, en effet pour les quatre premiers rapports de charge introduits (0.5 à 1.5) le rapport de charge interne est inférieur à 1, il est supérieur à 1 pour les deux autres (2 et 2.5). L’excès de charge est donc du même ordre de grandeur que pour les échantillons déjà étudiés, à savoir un excès de charge maximal de 20 %.
- les tailles de complexes primaires sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour le pH 4.7 (à rapport de charge introduit équivalent).
- la taille est croissante lorsque le rapport de charge introduit $[-]/[+]_{intro}$ augmente et les complexes primaires possèdent une couronne lorsque $[-]/[+]_{intro} > 1$.

6.1.1.2 Globules à pH 4.7

La figure 6.2 représente les signaux de DNPA obtenus pour le pH 4.7 à sept rapports de charge introduits compris entre 0.5 et 3.3. Quatre de ces rapports de charge ont été présentés dans le chapitre 4 et sont ici à nouveau présentés avec trois rapports de charge inédits. Ces trois nouveaux rapports de charge (0.5, 1.33 et 2.5) possèdent les mêmes caractéristiques que ceux précédemment étudiés, caractéristiques résumées en 6.1.1.1. Quelques points sont à noter cependant. De la même manière que pour le rapport de charge introduit 0.65, la quantité de polyelectrolyte introduite pour le rapport 0.5 est très faible et la statistique du signal mesuré lorsque les protéines sont éteintes à grands q est trop mauvaise pour que le signal soit représenté. A l’autre extrême, le rapport 2.5 également inédit, il est possible d’observer à moyen q ($\approx 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) un épaulement dû à la présence de polyelectrolyte libre, comme dans le cas du rapport de charge introduit 3.33 du chapitre précédent. La statistique n’est cependant pas suffisante dans cette gamme de vecteurs d’onde pour déterminer précisément la concentration en polyelectrolyte libre. Ce signal de polyelectrolyte libre n’est d’ailleurs pas soustrayable de la même façon que celui de la protéine du signal total, puisque la position du vecteur d’onde du pic de corrélation dépend de la concentration en chaînes libres qu’il faudrait connaître avec précision pour une soustraction correcte.

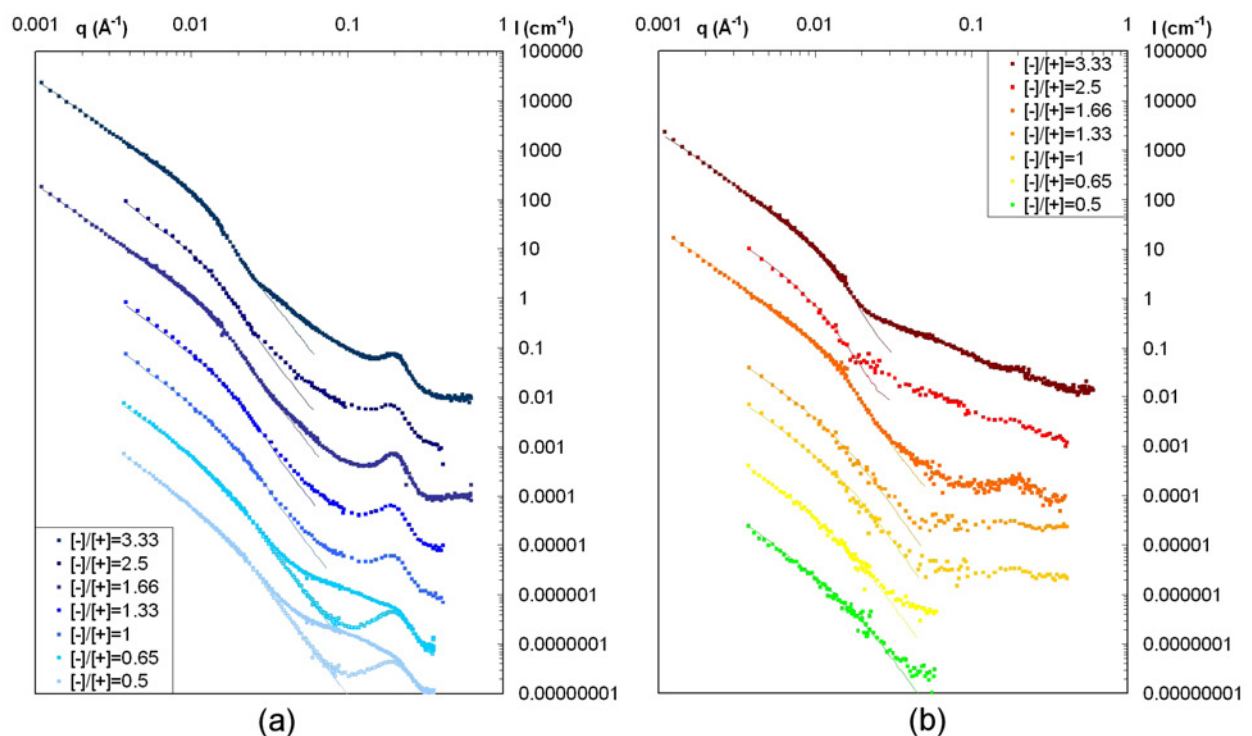


FIG. 6.2 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit pour $\text{pH} = 4.7$ ainsi que leurs ajustements à petits q . (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les sept rapports de charge décalées d'un facteur 10. Les courbes du rapport 0.5 et 0.65 sont représentées avec et sans soustraction du signal de lysozyme libre. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les sept rapports de charge séparées d'un facteur 10.

Le tableau 6.2 reporte les résultats issus des différents ajustements pour les sept rapports de charge étudiés. On notera que le rapport de charge interne final est toujours proche de 1 comme dans les cas étudiés dans le chapitre 5. Seul le rapport de charge introduit 0.5 mène à un excès de charges positives légèrement plus important que les autres. Contrairement au cas du pH 3, le passage d'un excès de charges positives à un excès de charges négatives a lieu pour un rapport de charge introduit plus bas puisque situé entre 1 et 1.33. Les données des trois nouveaux rapports de charges introduits s'intègrent parfaitement aux résultats du chapitre 5 : les tailles de complexes mesurées sont croissantes lorsque $[-]/[+]_{intro}$ est augmenté et il apparaît une couronne à partir de $[-]/[+]_{intro} = 1.33$ et que l'on obtient de la protéine libre pour $[-]/[+]_{intro} = 0.5$ et 0.65 et du polyelectrolyte libre pour $[-]/[+]_{intro} = 2.5$ et 3.33.

	R_{prot}	R_{pol}	σ	Φ_{prot}	Φ_{pol}	$[-]/[+]_{intro}$
$[-]/[+] = 0.5$	68	68	0.48	0.3	0.06	0.77
$[-]/[+] = 0.65$	73	73	0.45	0.24	0.052	0.97
$[-]/[+] = 1$	73	73	0.45	0.19	0.041	0.91
$[-]/[+] = 1.33$	90	95	0.4	0.19	0.054	1.19
$[-]/[+] = 1.66$	114	154	0.37	0.27	0.069	1.06
$[-]/[+] = 2.5$	130	155	0.35	0.19	0.04	1.08
$[-]/[+] = 3.33$	154	164	0.31	0.3	0.075	1.04

TAB. 6.2 – Taille, composition interne et rapport de charge interne pour les sept rapports de charge étudiés pour le pH 4.7

6.1.1.3 Globules à pH 7

La figure 6.3 présente les courbes de diffusion de neutrons pour le pH 7 à cinq rapports de charge introduits compris entre 0.5 et 3. Comme pour les pH 3 et 4.7 les données du rapport de charge 0.5 sont représentées avec et sans soustraction de la protéine libre. Pour le rapport $[-]/[+]_{intro} = 3$ lors de la réalisation pratique des expériences, il n'a pas été possible de réaliser les mesures à très petits vecteurs d'ondes par manque de temps. La statistique faible sur le signal du polyelectrolyte ne permet donc pas de modéliser la courbe avec une précision raisonnable.

Comme pour les deux précédents pH étudiés, les courbes conservent les mêmes caractéristiques résumées en 6.1.1.1. Elles sont néanmoins plus difficiles à exploiter pour plusieurs raisons. Tout d'abord la taille des complexes primaires est beaucoup plus importante (les rayons varient de 150 à plus de 300 Å) ce qui rend les ajustements moins aisés puisqu'ils sont réalisés sur une gamme de q trop limitée aux petits q . Ensuite, comme la protéine porte moins de charge à ce pH élevé, la concentration en polyelectrolyte nécessaire pour obtenir la stoechiométrie de charge est plus faible. Les signaux mesurés lorsque le signal de la protéine

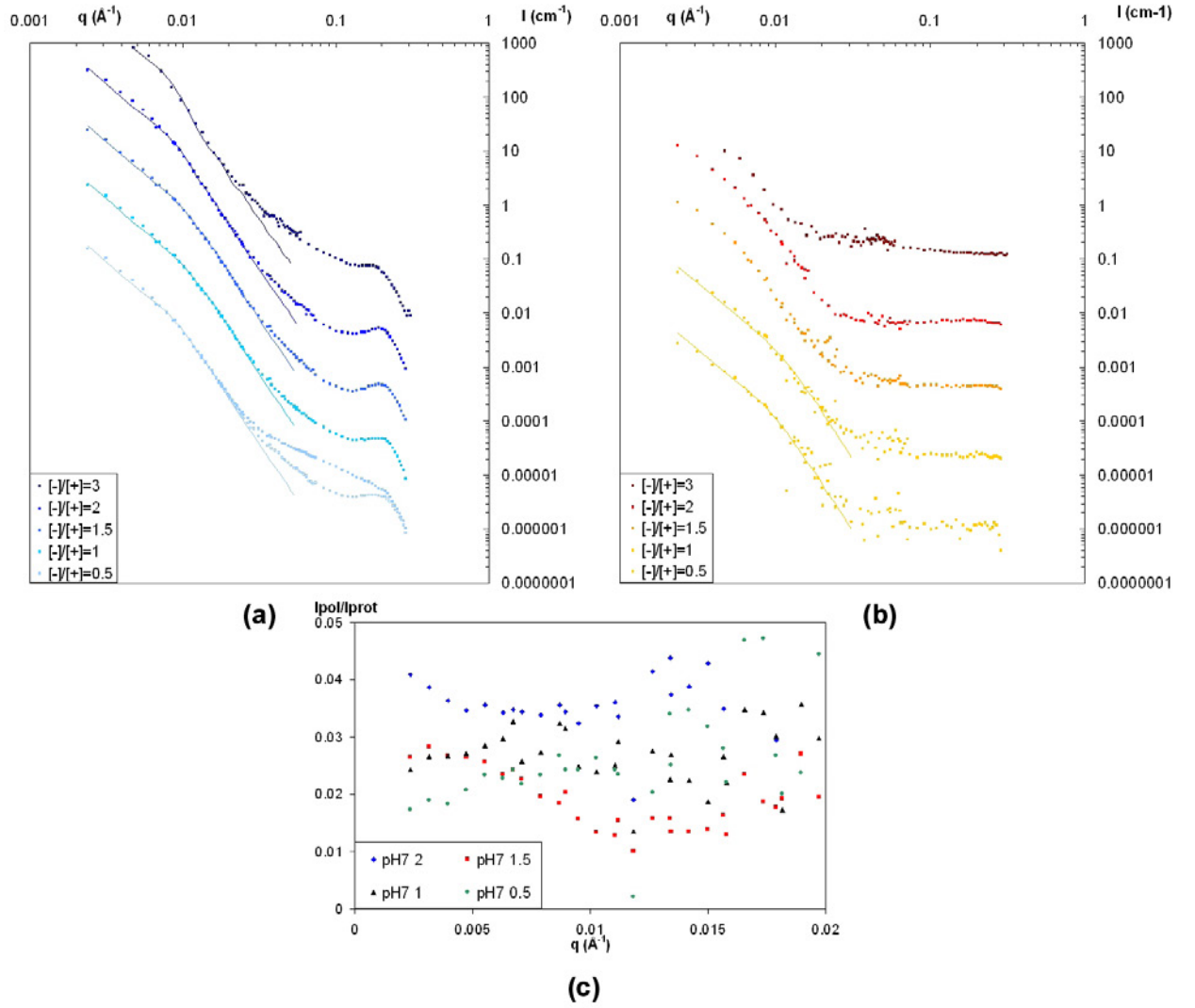


FIG. 6.3 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit pour $\text{pH}=7$ ainsi que leurs ajustements à petits q . (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les cinq rapports de charge décalées d'un facteur 10. La courbe du rapport 0.8 est représentée avec et sans soustraction du signal de lysozyme libre. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les cinq rapports de charge séparées d'un facteur 10. (c) : rapports des intensités I_{pol}/I_{prot} pour $[-]/[+]_{intro} = 0.5$ à 2.

est éteint ont donc un mauvais rapport signal/bruit (le bruit de fond incohérent, provenant majoritairement du solvant, est similaire dans tous les échantillons). Il n'a donc pas été possible de modéliser la diffusion du polyélectrolyte.

Nous avons néanmoins reporté sur la figure 6.3 (c) les rapports de signaux polyélectrolytes/protéines I_{pol}/I_{prot} à petits q pour les rapports de charges $[-]/[+]_{intro} = 0.5$ à 2. Ces courbes sont très similaires à celles de la figure 4.9 du chapitre 4 :

- pour les rapports de charge 0.5 et 1, I_{pol}/I_{prot} est constant à petits q , indiquant que les complexes n'ont pas de couronne de chaînes de PSS. La valeur de I_{pol}/I_{prot} permet l'obtention du rapport de charge interne qui est très proche de 1 pour les deux échantillons (tableau 6.3). Le signal des chaînes de PSS peut alors être convenablement modélisé à partir des valeurs de R_{comp} et issues de la modélisation du signal du lysozyme.

- pour le rapport $[-]/[+]_{intro} = 1.5$, I_{pol}/I_{prot} est fortement croissante lorsque q tend vers 0 (comme pour l'échantillon $[-]/[+]_{intro} = 1.66$ à pH 4.7), ce qui indique l'existence d'une couronne de chaînes de PSS sur les complexes primaires. Il n'est cependant pas possible d'évaluer le rapport de charge interne pour cette valeur de rapport de charge.

- pour le rapport de charge $[-]/[+]_{intro} = 2$, I_{pol}/I_{prot} croît beaucoup plus faiblement lorsque q tend vers 0. Il y a donc une mince couronne de polyélectrolyte sur ces complexes. La faible décroissance de I_{pol}/I_{prot} permet, à partir de la valeur minimale de I_{pol}/I_{prot} pour laquelle la statistique est raisonnable (entre 0.005 et 0.015 Å⁻¹), l'estimation d'une valeur du rapport de charge interne égale à 1.2, donc toujours proche de 1.

Le tableau 6.3 reporte les résultats issus des mesures de DNPA sur les échantillons réalisés à pH 7. Seules les valeurs correspondant aux signaux des protéines proviennent des ajustements.

	R_{prot}	R_{pol}	σ	Φ_{prot}	Φ_{pol}	$[-]/[+]_{intro}$
$[-]/[+] = 0.5$	120	120	0.5	0.17	0.025	0.95
$[-]/[+] = 1$	112	112	0.45	0.2	0.021	0.91
$[-]/[+] = 1.5$	120		0.45	0.22		
$[-]/[+] = 2$	150		0.5	0.21	0.036*	1.12*
$[-]/[+] = 3$	220		0.5	0.25		

TAB. 6.3 – Taille, composition interne et rapport de charge interne pour les cinq rapports de charge étudiés pour le pH 7. * rapport de charge et Φ_{pol} estimés à partir du rapport des intensités à petits q .

Les tailles de complexes sont plus élevées que pour les autres pH. Les complexes ont par ailleurs une polydispersité supérieure : σ devient supérieur à 0.45. Le rapport de charge interne reste néanmoins proche de 1 dans les échantillons pour lequel il est possible de

l'évaluer.

6.1.2 Variation de la densité de charge sur le polyélectrolyte : sulfonation partielle

Nous avons dans un second temps modifié la densité de charges sur le polyélectrolyte. Pour ce faire, nous avons utilisé des chaînes de PSS avec un taux de charge de 0.5. Ce taux de charge peut en effet être contrôlé lors de la sulfonation des chaînes (cf paragraphe 2.1.3.2). Cette post-sulfonation étant statistique, il y a en moyenne un monomère sur deux portant une charge. Puisque les monomères restant sont composés de motifs styrène, ces chaînes sont susceptibles d'interagir de façon hydrophobe avec les protéines. Contrairement au cas précédent où seules les interactions électrostatiques sont modifiées lors de la variation du pH, la variation du taux du charge du PSS modifie à la fois les interactions électrostatiques et hydrophobes. En pratique, nous nous sommes placés à pH= 4.7 et avons fait varier les rapports de charge introduits entre 0.5 et 3. Pour un rapport de charge donné, la concentration introduite en polyelectrolyte est double de celle du paragraphe 6.1.1.2. La figure 6.4 montre les courbes de diffusion obtenues pour les six rapports de charge mesurés.

On y observe :

- une grande similitude pour la de diffusion de protéine ; la structure formée reste proche de celle observée dans la partie 6.1.1. Comme précédemment il n'apparaît de la protéine libre que lorsque le rapport de charge introduit est inférieur à 1.

- par contre le signal de polyélectrolyte diffère de façon assez importante des signaux observés jusque-là. Si la réminiscence du pic inter-protéines à 0.2 \AA^{-1} est bien observée, il n'est plus possible d'observer de régime à q intermédiaire où le signal décroît en q^{-4} , ni de cassure de pente nette à petits q entre un régime en q^{-4} et un régime en $q^{-2.1}$.

- pour le rapport de charge $[-]/[+]_{intro} = 3$, il est néanmoins possible d'observer un léger pic vers 0.02 \AA^{-1} lié à la présence de chaînes libres. Ce pic est situé à des vecteurs d'onde beaucoup plus faible que celui observé à même pH sur des chaînes totalement sulfonées (vers 0.04 \AA^{-1} , cf figure 6.2) pour les plus hauts rapports de charge introduits. Ceci est en accord avec les résultats pour les solutions de polyélectrolyte sans protéine : un abaissement du taux de sulfonation décale fortement le pic des chaînes de PSS vers les petits q (cf partie 3.6.2).

Revenons à l'absence de variation en q^{-4} pour le signal du PSS. Les complexes primaires, dont l'existence est prouvée sans ambiguïté par le signal du lysozyme lorsque le signal des chaînes est éteint (figure 6.4 (a)), ne présentent pas d'interface nette du point de vue du polyélectrolyte. Ceci peut être lié à la conformation des monomères hydrophobes au voisinage de la surface des complexes primaires. Si ces monomères forment des perles hydrophobes,

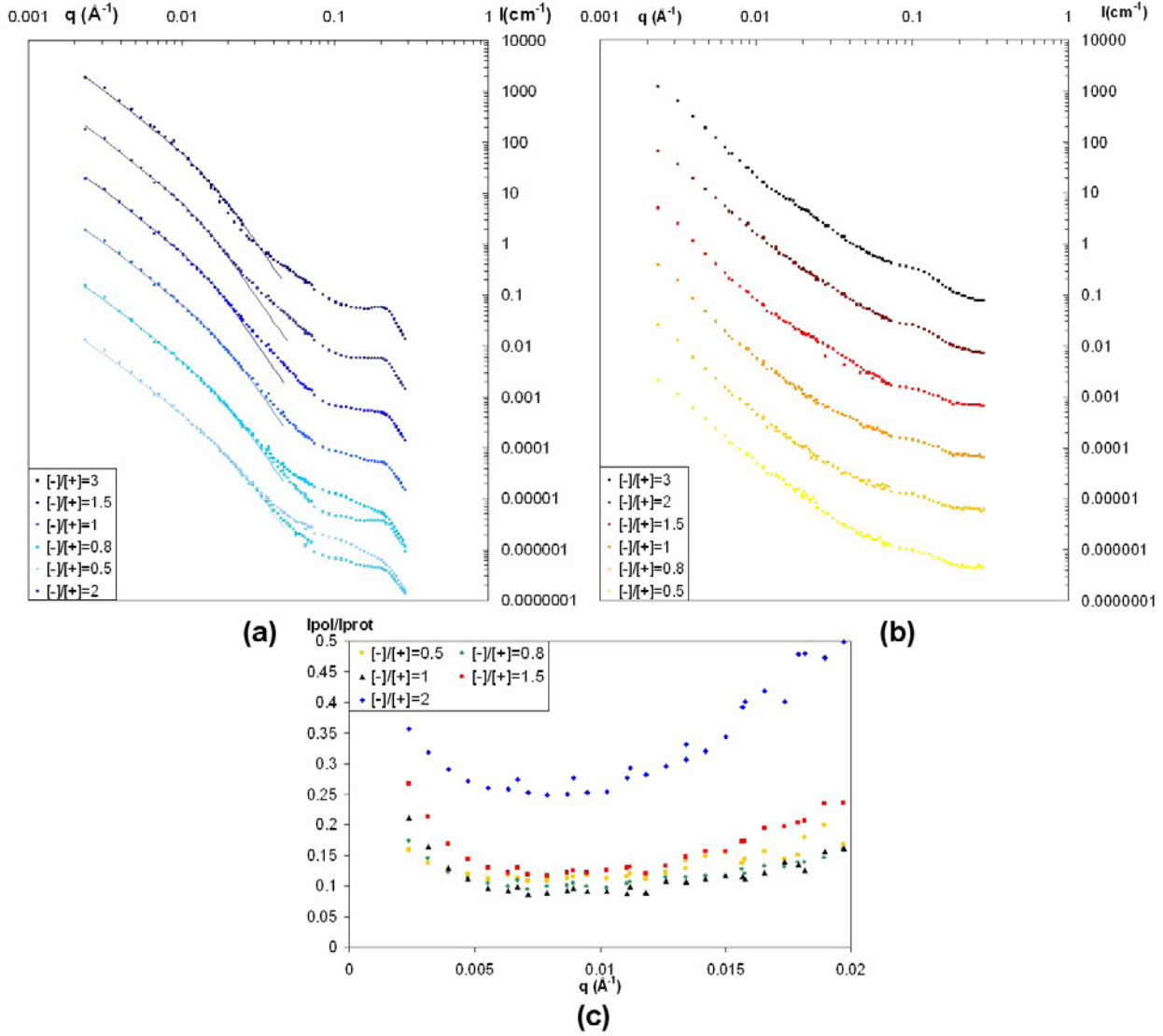


FIG. 6.4 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit pour $\text{pH} = 4.7$ et un PSS à $f = 0.5$ ainsi que leurs ajustements à petits q . (a) : courbes de diffusion de la protéine pour les six rapports de charge décalées d'un facteur 10. La courbe du rapport 0.8 est représentée avec et sans soustraction du signal de lysozyme libre. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les six rapports de charge décalées d'un facteur 10. (c) : rapports des intensités I_{pol}/I_{prot} pour $[-]/[+]_{intro} = 0.5$ à 2.

	R	σ	Φ_{prot}	$[-]/[+]_{interne}$
$[-]/[+] = 0.5$	50	0.5	0.19	0.89
$[-]/[+] = 0.8$	60	0.5	0.18	0.89
$[-]/[+] = 1$	70	0.45	0.175	0.82
$[-]/[+] = 1.5$	85	0.45	0.175	0.91
$[-]/[+] = 2$	85	0.5	0.162	1.25
$[-]/[+] = 2.5$	110	0.5	0.16	

TAB. 6.4 – Taille, composition interne en protéine et rapport de charge interne calculé à partir du rapport des intensités à petits q pour les six rapports de charge étudiés pour le PSS $f = 0.5$

comme proposé théoriquement sur des solutions de chaînes partiellement sulfonées seules par Dobrynin et al.⁵ et vérifié expérimentalement par Baigl⁸⁸, ces perles peuvent créer une rugosité importante du point de vue des chaînes sur les complexes primaires et "tuer" la décroissance en q^{-4} du signal. Ceci rend l'ajustement des courbes avec la méthode décrite au chapitre 4 impossible.

Une estimation du rapport de charge interne est néanmoins faisable à partir du rapport I_{pol}/I_{prot} . En effet, à très petits q , les échelles spatiales sondées étant très supérieures à la taille caractéristique des complexes primaires, le signal du polyélectrolyte n'est plus sensible à leur rugosité. On voit bien en figure 6.4 (c) que le rapport I_{pol}/I_{prot} tend vers une valeur quasiment constante sur une large gamme de q (sauf pour $[-]/[+]_{intro} = 3$, pour lequel I_{pol}/I_{prot} est croissant) suffisante pour estimer le rapport de charge interne même pour $[-]/[+]_{intro} = 2$ où elle est plus étroite. Le tableau 6.4 reporte les résultats issus des différents ajustements pour les six rapports de charge étudiés avec le PSS $f = 0.5$ ainsi que les rapports de charge interne estimés à partir de I_{pol}/I_{prot} . Le rapport de charge interne reste proche de 1 pour tous les rapports de charges introduits, ce qui suggère que les interactions hydrophobes jouent un rôle négligeable dans la complexation lorsque le rapport de charge introduit est proche de 1.

Remarque : le fait que I_{pol}/I_{prot} soit presque constant jusqu'à des valeurs de $[-]/[+]_{intro} = 2$ suggère qu'il n'y a pas de couronne sur les complexes formés de chaînes partiellement sulfonées ou que cette couronne est de très petite taille. Ceci peut s'expliquer par la faible longueur des chaînes étudiées ($N = 40$) associé à un étirement plus faible dû à une conformation différente des chaînes partiellement sulfonées.

[5] Dobrynin, A.; Colby, R. H.; Rubinstein, M. *macromolecules* **1995**, 28, 1859-1871.

[88] Baigl, D.; Sferrazza, M.; Williams, C. E. *Europhysics Letters* **2003**, 62, 110-116.

6.1.3 Essai avec une autre protéine

Nous profitons ici de la présentation des résultats sur les globules denses pour montrer les résultats de mesure sur des complexes préparés avec une autre protéine. En effet, afin de vérifier si la structure est particulière à notre système nous avons préparé des échantillons avec de la napine. Cette protéine est très proche de lysozyme tant en masse qu'en taille et en charge. Elle nous a été fournie par Isabelle Schmidt et Monique Axelos de l'INRA de Nantes et a été purifiée par leurs soins. La purification étant fastidieuse et les quantités nécessaires à une expérience de DNPA assez élevées, nous n'avons effectué qu'un seul test.

La courbe 6.5 montre les signaux observés pour les deux contrastes mesurés.

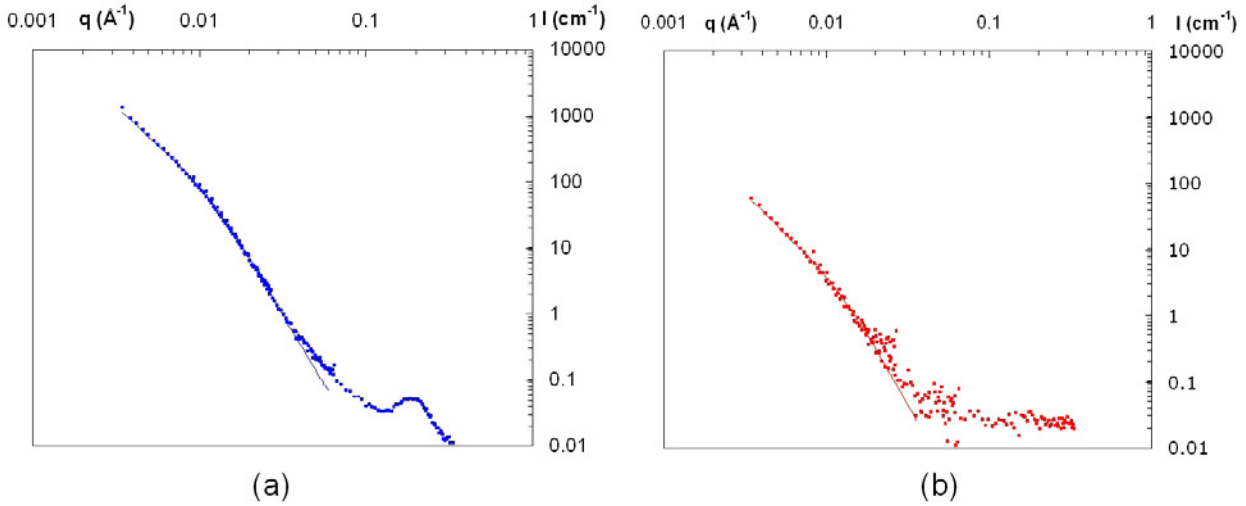


FIG. 6.5 – Courbes DNPA pour des complexes avec de la napine à $\text{pH} = 4.7$ pour $[-]/[+]_{intro} = 1$ ainsi que leurs ajustements à petits q . (a) : courbe de diffusion de la protéine. (b) : courbe de diffusion du polyélectrolyte

Ces deux courbes montrent que la structure obtenue est exactement la même que pour les échantillons avec du lysozyme. Les courbes obtenues sont strictement similaires à celles vues jusqu'à présent. La méthode d'ajustement fonctionne donc également pour cet échantillon et nous avons pu en déduire la taille et la composition interne des globules. La taille obtenue est de 90 \AA avec une polydispersité de 0.5 soit du même ordre de grandeur que l'échantillon équivalent en lysozyme. Les fractions volumiques internes mesurées sont $\Phi_{prot} = 0.21$, $\Phi_{pol} = 0.04$ soit un rapport de charge interne $[-]/[+]_{intra} = 0.8$. La forte compacité ainsi que la stoechiométrie à l'intérieur du cœur qui ont été observés jusqu'ici sont donc retrouvés pour la napine.

6.2 Charge des complexes

6.2.1 Charge interne des complexes à partir des mesures de DNPA

L'ensemble des mesures présentées dans la partie 6.1 permet d'obtenir le rapport de charge interne de complexes primaires formés de lysozyme et de chaînes de PSS de densité de charge variables. Nous rappelons que ce rapport de charge interne peut être obtenu de deux façons différentes.

Lorsque le rapport charge introduit est inférieur ou égal à 1, les complexes formés ne possèdent pas de couronne de polymère. Ainsi leur taille est identique du point de vue de la protéine et du polyélectrolyte. Nous avons également vu que dans ce cas le rapport des intensités permet un accès direct au rapport de charge interne. Pour rappel :

$$I_{comp}(q) = \Phi_{comp} \Delta \rho_{comp}^2 V_{comp} P_{comp}(q) S_{comp}(q) \quad (6.1)$$

Cette expression est valable pour un contraste donné avec $\Delta \rho_{comp}^2$ qui est fonction de la fraction interne du composé concerné.

Comme Φ_{comp} , V_{comp} , $P(q)$ et $S(q)$ sont identiques pour les deux contrastes on obtient :

$$\frac{I_{PSS}(q)}{I_{lyso}(q)} = \left(\frac{\Phi_{PSS_interne}}{\Phi_{lyso_interne}} \right)^2 \quad (6.2)$$

Ainsi la mesure du rapport des signaux à petits q est donc directement proportionnelle au carré du rapport de charge interne et est donc une méthode extrêmement sensible pour mesurer ce rapport de charge interne. La mesure peut être effectuée sans avoir besoin d'ajuster les courbes de DNPA.

La figure 6.6 montre ces rapports d'intensité calculés pour les quatre cas étudiés pour les rapports de charge introduits inférieurs à 1. Les lignes continues sont les valeurs de rapport d'intensité pour un rapport de charge interne égal à 1. Il n'y a pas de facteur 2 entre les rapports théoriques obtenus à pH 4.7 pour les taux de sulfonation $f = 0.5$ et 1 puisque le volume spécifique moyen d'une unité monomérique est inférieure lorsque $f = 0.5$. Les mesures expérimentales sont constantes sur une gamme de q variant de 0.003 à 0.02 Å⁻¹ et sont très proches des rapports d'intensités théoriques permettant d'avoir un rapport de charge interne égal à 1. La simple lecture de la valeur de I_{pol}/I_{prot} pour un échantillon donné permet donc, connaissant le pH et le taux de sulfonation utilisé, la détermination du rapport de charge interne des complexes primaires.

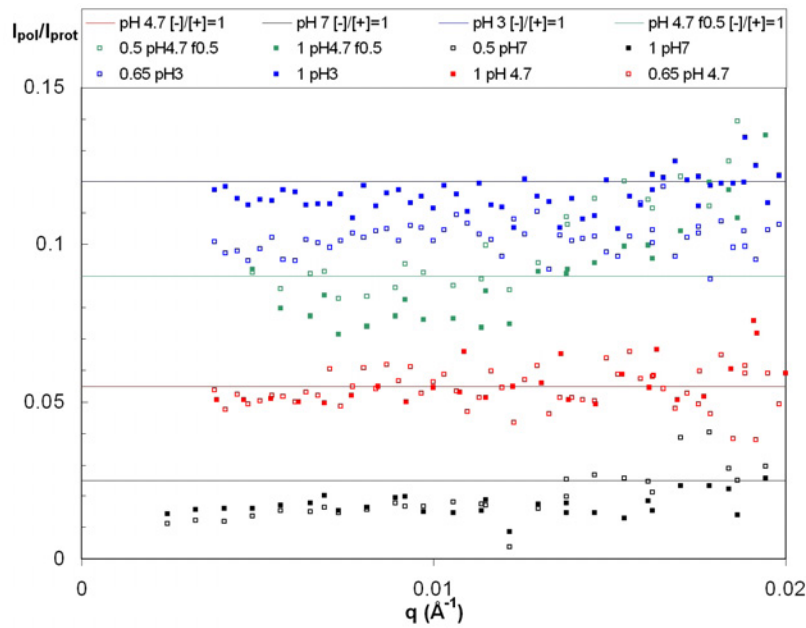


FIG. 6.6 – Rapports des signaux de polyélectrolyte et de protéine pour des rapports de charge introduits inférieurs à 1 et pour les trois pH étudiés et le PSS $f = 0.5$

Lorsque le rapport charge introduit est supérieur à 1, les complexes possèdent une couronne de polymère et le rapport de charge interne ne peut être déterminé qu'après avoir ajusté les signaux du polyélectrolyte et de la protéine. C'est seulement une fois ces ajustements effectués et les fractions internes en polyélectrolyte et en protéine déterminées que le rapport de charge interne est déterminé.

Les valeurs issues des ajustements et celles directement obtenues du rapport des intensités sont toutes représentées dans la figure 6.7. Comme il est possible de le voir, **le rapport de charge interne est toujours proche de 1, quels que soient le rapport de charge introduit, le pH et l'hydrophobicité partielle des chaînes**. Les interactions électrostatiques directes entre charges opposées sont donc complètement prépondérantes dans la formation des complexes primaires. Ceci est cohérent avec le relarguage des contre-ions mesuré dans la partie 4. En particulier, la présence de monomères hydrophobes pour les chaînes de PSS partiellement sulfonées ou la présence d'un nombre important de charges négatives (malgré une charge totale effective positive) portées par la protéine (8 à pH 4.7, 10 à pH 7 alors qu'il n'y en a que 2 à pH 3) ne modifient ni la structure globale des complexes primaires, ni le rapport de charge interne. Les complexes sont soit en léger excès de charges positives soit en léger excès de charges négatives. Le passage de l'excès positif à l'excès négatif se fait pour un rapport de charge introduit compris entre 1 et 1.5 environ (sauf pour le pH 3 où le seuil est à 2). Dans tous les cas les espèces en excès du point de vue de charges restent en

solution.

Il faut rappeler ici que nous considérons une détermination des rapports de charge au coeur des complexes. Pour les complexes sans couronne de polyélectrolyte il s'agit donc d'une détermination directe de leur charge. Par contre pour les complexes avec couronne il s'agit du rapport de charge au coeur des complexes et donc pas de la charge globale des complexes primaires, couronne comprise.

Un résumé est visualisé grâce à la figure 6.7 ; on voit que la complexation du coeur est stoechiométrique et ce quels que soient les paramètres de densité de charge sur la protéine et le polyélectrolyte. Le passage du faible excès positif au faible excès négatif a lieu toujours autour du rapport de charge introduit 1 ; toutes les courbes se superposent en fonction de ce paramètre de rapport de charge introduit.

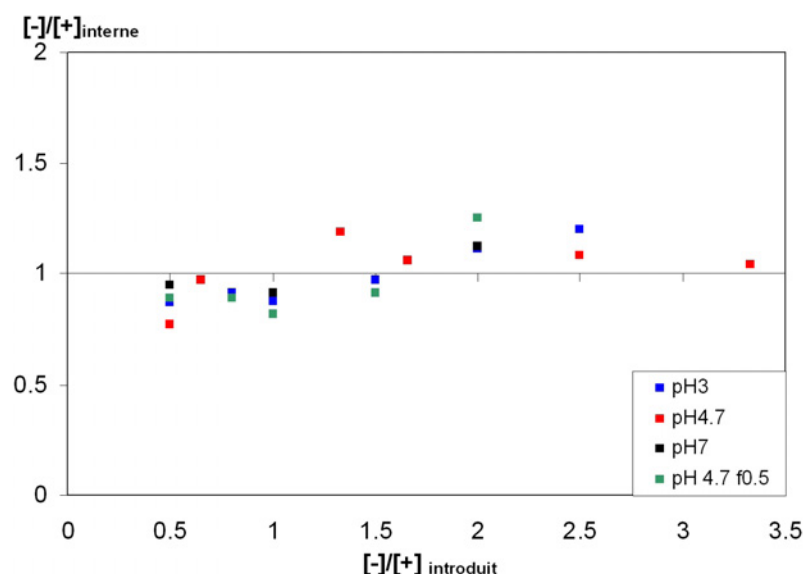


FIG. 6.7 – Rapport de charge interne en fonction du rapport de charge introduit pour les trois pH étudiés et le PSS $f = 0.5$

Revenons maintenant aux structures obtenues : elles sont également toutes semblables à celle présentées sur la figure 5.11. Seules les structures obtenues lorsque les chaînes ont un taux de sulfonation inférieur à 1 diffèrent légèrement. Nous pensons que la présence d'éventuelles perles hydrophobes doit rendre la surface des complexes plus rugueuse et perturber la formation de couronnes de PSS lorsque le rapport de charge introduit est supérieur à 1.

6.2.2 Charge effective des complexes

Si $[-]/[+]_{interne}$ était strictement égal à 1, les globules auraient une charge nulle, au moins pour $[-]/[+]_{intro} < 1$. Cela devrait destabiliser la structure. Il était donc important

de déterminer si les complexes primaires portent des charges globales du fait des légers excès de charge interne déterminés en DNPA et de la présence d'espèces chargées en surface. Nous avons donc effectué des mesures de zétamétrie sur les complexes pour déterminer leur charge effective. Ces mesures ont été faites au centre INRA de Nantes dans l'unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) avec l'aide de Dominique Guibert du groupe Interfaces et Systèmes Dispersés.

6.2.2.1 Principe de la mesure

Le potentiel zêta d'une particule chargée se définit comme le potentiel électrique à la surface de la couche de Stern de cette particule. L'épaisseur de la couche de Stern est la distance à partir de la surface de la particule où les contre-ions sont considérés comme condensés. Le potentiel zêta est donc plus faible que le potentiel électrique créé par les charges structurales de la particule puisqu'il est fortement réduit par la couche de contre-ions condensés. C'est donc une mesure de la charge effective que porte la particule, d'autant plus qu'une mesure de zétamétrie consiste à imposer un champ électrique et à mesurer le déplacement des particules chargées.

Mais nous avons vu tout au long de notre étude que les complexes sont agrégés en grappes jusqu'à des échelles de l'ordre de plusieurs microns. Donc si nous souhaitons mesurer le potentiel zêta des complexes primaires (et donc déterminer leur charge) il est nécessaire de les disperser au maximum pour éviter que le déplacement dû au champ électrique soit perturbé par la taille trop importante des objets.

Or il faut effectuer une dilution importante (1/1000) pour des raisons strictement liées aux capacités intrinsèques de l'appareil qui n'arrive plus à tracer une particule lorsque le nombre de particules total sur l'image est trop grand. Cette dilution permet en même temps de détruire l'organisation à grande échelle des complexes primaires et de créer des objets plus petits. Pour ces objets il n'est pas nécessaire de descendre jusqu'à la taille des complexes primaires individuels pour obtenir une mesure de la charge des particules. En effet si la mesure concerne un agrégat ramifié de plusieurs complexes primaires, sa charge sera n fois celle d'un complexe mais il faudra une force n fois plus grande pour mettre l'agrégat en mouvement et donc le potentiel mesuré restera le même puisque la vitesse mesurée sera la même.

Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour la mesure de ces potentiels zêta. La première est une technique de microélectrophorèse en veine liquide. Elle consiste à mesurer la vitesse v des particules à l'aide d'un microscope. On éclaire la solution avec un laser et les particules renvoient la lumière ce qui permet de les suivre (voir figure 6.8) lors de leur déplacement. La vitesse est mesurée grâce à l'effet doppler : l'appareil mesure le déphasage

du faisceau réfléchi et en déduit statistiquement la distribution de vitesse des particules. Le rapport entre la vitesse de migration électrophorétique et le champ électrique appliqué est généralement constant et est assimilé à la mobilité électrophorétique $\mu = v/E$. Il faut cependant s'assurer que les vitesses mesurées sont exclusivement dûes à l'action du champ électrique appliqué E . Parmi les phénomènes parasites figurent principalement les réactions aux électrodes, les mouvements de convection dus à l'échauffement de l'échantillon par effet Joule et l'électroosmose. Du fait de l'électroosmose le profil de mobilité des particules soumises à l'électrophorèse est parabolique ; il existe alors une région où la vitesse du milieu de suspension est nulle. C'est à cet endroit nommé niveau stationnaire qu'il convient d'effectuer les mesures. Ce niveau stationnaire se détermine en déplaçant le plan focal du microscope jusqu'à trouver la région du tube de mesure où la convection est nulle et les particules statiques avant application du champ électrique. Lors de la mesure une série de photographies sont prises, donnant la position d'une particule à un temps t .

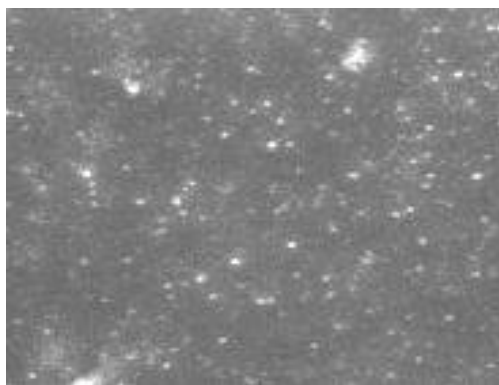


FIG. 6.8 – Photographie au microscope d'une solution de particules éclairée par un laser dans le zétamètre.

Un logiciel traite ensuite ces photographies et traque le déplacement de chaque particule qu'il aura considéré. Une distribution des valeurs de migration est déduite de ces déplacements. Dans le cas de nos mesures, la distribution obtenue est toujours très étroite, ce qui prouve que toutes les particules d'un même échantillon ont des charges proches les unes des autres.

La seconde méthode utilisée est une mesure automatique effectuée grâce à un zétamètre Malvern Zetasizer. Cet appareil est totalement automatique et la mesure est faite dans une cuve possédant deux électrodes aux extrémités. L'appareil impose un potentiel et mesure le déplacement des particules de la même manière que pour l'électrophorèse en veine liquide. Cependant dans ce cas il n'est pas possible de savoir à priori si la mesure a été réalisée au niveau où l'échantillon est en régime stationnaire c'est pourquoi ces mesures n'ont été effectuées que pour vérifier les valeurs mesurées avec la première méthode. Ce second appareil

fournit également une mesure de la taille des particules. Nous avons obtenus des rayons compris entre 500 et 1000 Å ; ceci pourrait signifier que la dispersion après dilution a mené à des objets formés de moins de quelque dizaines de complexes primaires.

6.2.2.2 Résultats

La figure 6.9 montre les résultats de zétamétrie. Nous avons choisi quatre rapports de charge introduits dans les trois pH utilisés précédemment pour les mesures de DNPA (3, 4.7 et 7), ainsi qu'une série d'échantillons avec un PSS à taux de sulfonation $f = 0.5$.

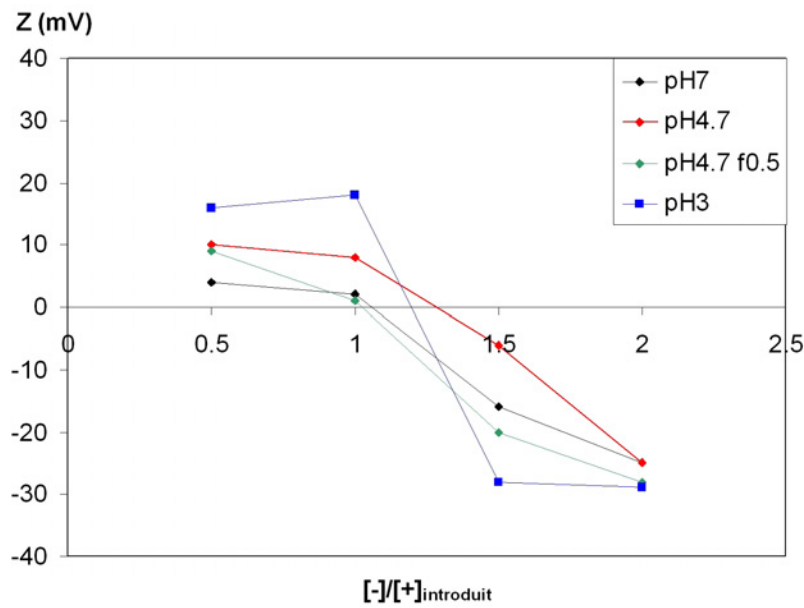


FIG. 6.9 – Mesures du potentiel zêta des complexes pour quatre rapports de charge introduits à pH 3, 4.7 et 7, ainsi que pour un PSS $f = 0.5$ à pH 4.7.

Nous avons vu dans la section précédente (figure 6.7) que les échantillons formés avec un rapport de charge introduit inférieur ou égal à 1 ont un léger excès de charges positives et que ceux formés avec un rapport de charge introduit supérieur à 1 ont un léger excès de charges négatives. Ces résultats sont ici confirmés par les mesures de zétamétrie pour les trois pH ainsi que pour $f = 0.5$.

Une analyse un peu plus fine permet cependant de dégager des informations plus précises. Il faut se rappeler à ce stade que la zétamétrie mesure la charge globale des objets, alors que dans la figure 6.7 nous avons représenté le rapport de charge interne. Ainsi les complexes avec une couronne de polymère (négativement chargés) doivent donc avoir une charge négative globale négative plus importante (en valeur absolue). C'est ce qui est montré sur la figure 6.10 :

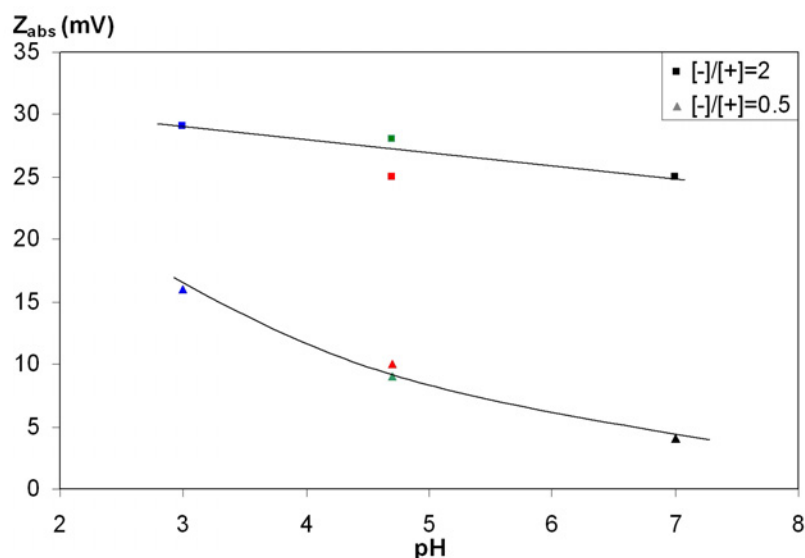


FIG. 6.10 – Valeurs absolues des potentiels zêta pour les rapports de charge introduits 0.5 et 2 en fonction du pH

- lorsque le rapport de charge introduit est égal à 2, les complexes portent tous une charge négative qui est plus élevée en valeur absolue que lorsqu'ils portent une charge positive (rapport de charge introduit inférieur à 1). Ceci est liée à la présence des couronnes de chaînes de PSS, qui augmentent le nombre de charges totales portées par les complexes primaires et leur confèrent donc une charge plus élevée. De plus la charge est indépendante du pH, en accord avec le fait que les couronnes ont toutes une taille du même ordre (comme nous le verrons dans la partie 6.3) et que la dissociation des charges du polyélectrolyte est indépendante du pH.

- à l'inverse, pour le rapport de charge 0.5 l'excès de charge n'est dû qu'à un excès de protéines dans le coeur et à la surface des complexes primaires. De ce fait la charge absolue globale est moins importante puisqu'il n'y a pas de couronne. La charge effective, positive, est ici dépendante du pH, et est d'autant plus importante que le pH est bas. Ceci est à relier au nombre de charges structurales positives que portent le lysozyme, qui augmente également lorsque le pH augmente. Ceci est confirmé par les résultats obtenus sur les deux échantillons réalisés à pH 4.7 et à $[-]/[+]_{intro} = 0.5$ pour deux taux de charges de PSS différents qui donnent la même charge effective pour les complexes.

Les résultats de zétamétrie confirment les mesures de rapports de charge internes obtenus à partir des ajustements de courbes de DNPA et permettent de faire une analyse plus fine des charges portées par les complexes primaires. L'évaluation du rapport de charge interne des complexes ne permet pas de déterminer si les excès de charges obtenus, positifs ou négatifs, proviennent d'une répartition aléatoire des charges dans les complexes ou plutôt

d'une répartition des espèces en excès dans les complexes primaires au voisinage de la surface. Les résultats de zétamétrie obtenus lorsque $[-]/[+]_{intro} < 1$ semblent néanmoins indiquer que cette deuxième situation est la plus vraisemblable. En effet, puisque les complexes primaires ont des structures (taille, compacité) très peu dépendantes du pH, il est probable que le nombre de charges positives portées par le lysozyme n'interagissant pas avec une chaîne de PSS soit pratiquement constant dans le coeur des complexes d'un échantillon à l'autre. Seules les charges portées par les espèces situées à la périphérie des complexes peuvent différer d'un échantillon à l'autre. Puisque la charge effective des complexes primaires est fortement liée au pH, c'est donc que cette charge est liée à ces espèces portées en périphérie. De plus, les résultats obtenus lorsque $[-]/[+]_{intro} > 1$ montre que la charge est essentiellement aux couronnes de PSS libres.

En résumé, les mesures de zétamétrie et de DNPA sont donc très complémentaires pour caractériser la charge des complexes primaires au coeur et en surface.

6.3 Evolution de la taille des complexes

Même si elle semble associée à une situation définie (les chaînes de PSS en régime dilué après interaction avec la protéine lors de la formation des complexes), l'origine d'une taille finie de complexe n'est pas triviale : les interactions électrostatiques entre espèces de charges opposées peuvent à priori mener à la formation d'agrégats de taille infinie ! Pour mieux appréhender le processus, nous présentons dans cette partie le bilan des tailles obtenues dans différentes situations expérimentales.

6.3.1 Effet du rapport de charge introduit

Discutons premièrement de l'évolution de la taille des complexes primaires en fonction du rapport de charge introduit. La figure 6.11 montre la taille moyenne (en tenant compte de la polydispersité, cf équation 5.8) des complexes primaires déterminées à partir du signal de la protéine pour trois pH (3, 4.7 et 7) ainsi que pour le PSS $f = 0.5$ au pH 4.7. Ces tailles tiennent donc uniquement compte du coeur des complexes et pas des éventuelles couronnes de polymère.

R_{moy} croît toujours avec $[-]/[+]_{intro}$, ne montre pas de variation avec le taux de sulfonation. Légèrement supérieur pour le pH 3, il est surtout plus grand pour pH 7 mais cela est lié à la largeur plus grande de la distribution, σ , qui font croître R_{moy} (cf tableau 6.3).

On peut aussi considérer le nombre moyen de protéines agrégées par complexe primaire N_{prot_comp} , l'augmentation du nombre d'agrégation est très importante puisque les complexes ont des compacités proches pour un pH ou un taux de sulfonation donné. N_{prot_comp} croît

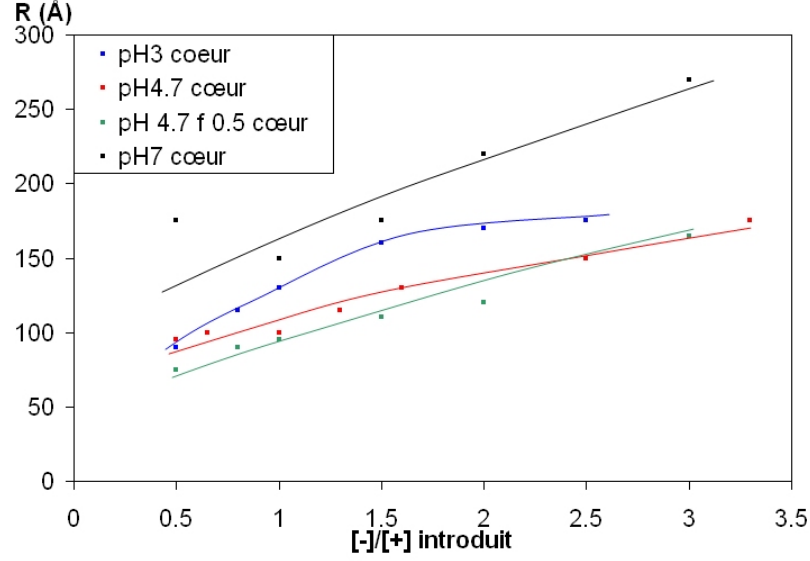


FIG. 6.11 – Taille du coeur des complexes primaires en fonction du rapport de charge introduit pour les trois pH étudiés et le PSS $f = 0.5$

typiquement d'un facteur 5 à 10 entre $[-]/[+]_{intro} = 0.5$ et $[-]/[+]_{intro} = 2.5$. La figure 6.12 présente le bilan de ces nombres d'agrégation. N_{prot_comp} est obtenu via :

$$N_{prot_comp} = \frac{4\pi}{3} \frac{R_{moy}^3 \Phi_{lyso_intra}}{V_{lyso}} \quad (6.3)$$

La figure 6.12 fait apparaître qu'à pH 4.7, le nombre d'agrégation est plus élevé pour $f = 1$ que pour $f = 0.5$ car les agrégats sont plus compacts. Les comportements en fonction du pH sont similaires à ceux obtenus sur R_{moy} .

Intéressons nous maintenant aux tailles extraites du signal du PSS. Pour $f = 1$ et pH 3 et 4.7, la différence des rayons extraits du signal de PSS et du signal de protéine donne les épaisseurs de la couronne de polymère reportées sur la figure 6.13. Pour le PSS $f = 0.5$ à pH 4.7 et pour le pH 7 pour $f = 1$, l'ajustement est impossible bien qu'elle existe si $[-]/[+]_{intro} > 1$.

Comme on peut le voir sur la figure 6.13, des couronnes ne sont observées que pour des rapports de charge introduits supérieurs à 1 comme cela a déjà été montré par ailleurs. On observe cependant qu'au contraire de la taille du coeur des complexes, la taille des couronnes est constante (de 30 Å pour le pH 4.7 et 20 Å pour le pH 3).

L'épaisseur de ces couronnes peut être reliée à plusieurs paramètres. Tout d'abord la taille des chaînes utilisées : le PSS à $N = 40$ monomères utilisé ici, en considérant une taille de monomère de 2 Å, aurait une taille maximale étirée de 80 Å (estimation maximaliste). Même si les chaînes de PSS dans les couronnes doivent être assez tendues du fait des répulsions

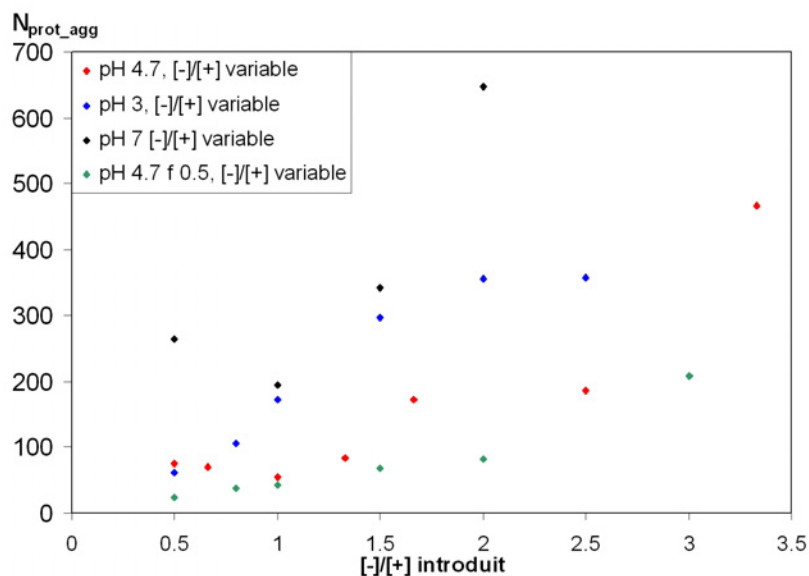


FIG. 6.12 – Nombre de protéines agrégées par complexe en fonction du rapport de charge introduit

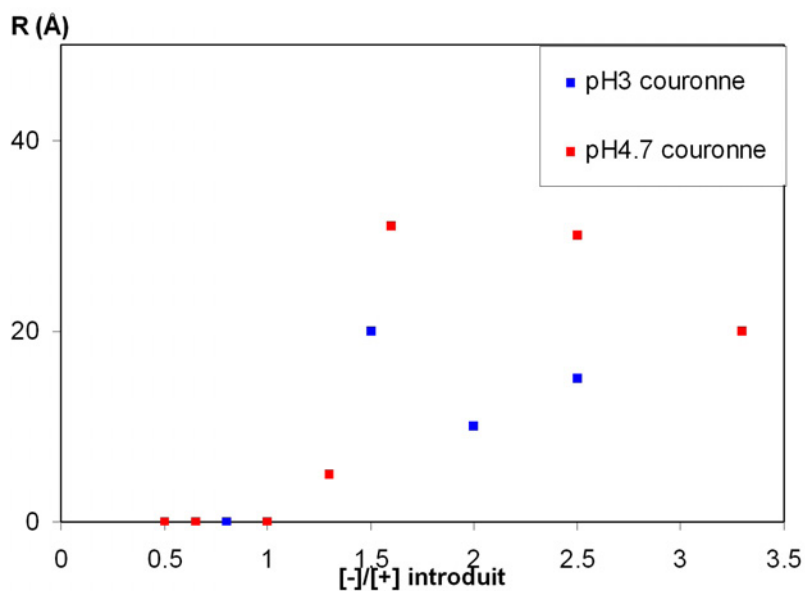


FIG. 6.13 – Taille de la couronne de polymère autour du coeur des complexes primaires en fonction du rapport de charge introduit pour deux pH

inter-chaînes, il doit y avoir un nombre suffisant de monomères à l'intérieur du complexe pour faire un point d'ancrage. Les épaisseurs de couronnes mesurées sont donc cohérentes avec un modèle de chaîne de PSS partiellement enfoui dans le coeur des complexes. Une épaisseur plus petite à pH 3 peut s'expliquer par le plus grand nombre de charges sur les protéines, qui ancrent alors plus les chaînes.

6.3.2 Effet de la concentration totale

Les résultats de la partie 6.3.1 suggèrent que lorsque le rapport de charge introduit est supérieur à 1, un excès de chaînes de PSS à la surface des complexes primaires génère plus de conformations pour lesquelles les protéines et les chaînes de PSS peuvent interagir électrostatiquement puisque les complexes primaires ont des tailles plus importantes. Dans ce cas, la taille finie des complexes doit être uniquement dépendante du rapport de charge introduit. Nous avons cherché à vérifier cette hypothèse en faisant varier la concentration totale en produit à un rapport de charge introduit fixé. Nous avons pour cela choisi le rapport de charge 1.66 et fait varier la concentration en protéine de 5 à 60 g/L, la concentration en PSS étant elle comprise entre 0.00625 et 0.075 M. Cette mesure a été effectuée à un pH de 4.7 et une force ionique initiale de 50 mM. La figure 6.14 montre les courbes du signal de la protéine pour les 6 concentrations initiales différentes. Nous avons choisi d'étudier le rapport 1.66 car les polydispersités obtenues pour ces rapport de charges sont faibles (de l'ordre de 0.3) et permettent des déterminations précises des tailles.

Les différentes courbes pour les différentes concentrations totales possèdent les mêmes caractéristiques globales de diffusion pour les chaînes courtes (système en régime dilué) vues jusqu'à présent. Seule la courbe pour la concentration en protéine de 60 g/L est légèrement différente des autres car elle a été réalisée dans un solvant à 80% D₂O (lors d'une expérience où nous avons utilisé les derniers mL de solutions mères de protéine et de polyélectrolyte préparées dans deux solvants différents). Ainsi à grands vecteurs d'onde le signal est un mélange de signal protéine et polyélectrolyte. Par contre dans la zone de q intermédiaire où se situe le signal des complexes primaires, la mesure permet de déterminer la taille de ce complexe primaire. On peut aussi noter que pour la mesure à 5 g/L, le signal devient assez faible aux grands q mais reste tout à fait suffisant aux petits q pour également permettre de déterminer la taille du complexe primaire. Contrairement à l'hypothèse que nous avons formulée au début de cette partie, la taille des complexes varie énormément avec la concentration.

Afin de mieux visualiser le comportement de la taille avec la variation de concentration totale, nous avons représenté les courbes de diffusion en $Iq^4(q)/\phi$. Sur cette représentation (figure 6.15), le changement de taille en fonction de la concentration totale est flagrant. On voit en effet le maximum se déplacer vers les plus petites valeurs de q , soit vers des tailles plus

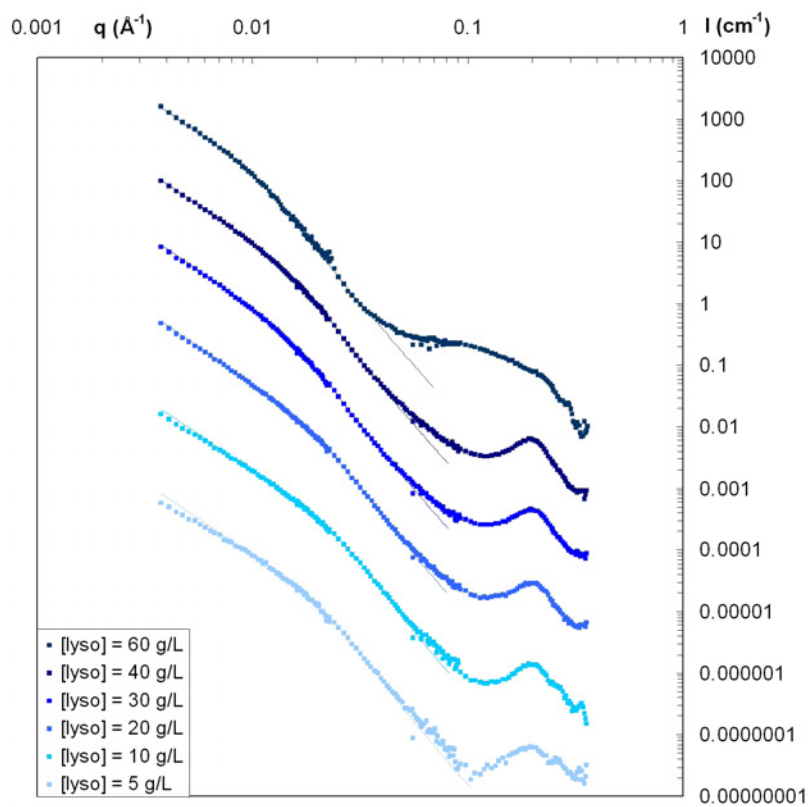


FIG. 6.14 – Courbes DNPA en fonction de la concentration en PSS introduite pour un rapport de charge introduit constant de 1.66 et un pH de 4.7 ainsi que leurs ajustements à petits q . Courbes de diffusion de la protéine pour les six concentrations décalées d'un facteur 10.

grandes et ce proportionnellement à la concentration totale introduite. L'intensité de la partie plate de la couche décroît également, en accord avec le fait que dans cette représentation ce plateau est proportionnel à la surface spécifique des complexes ($\approx 3/R_{comp}$).

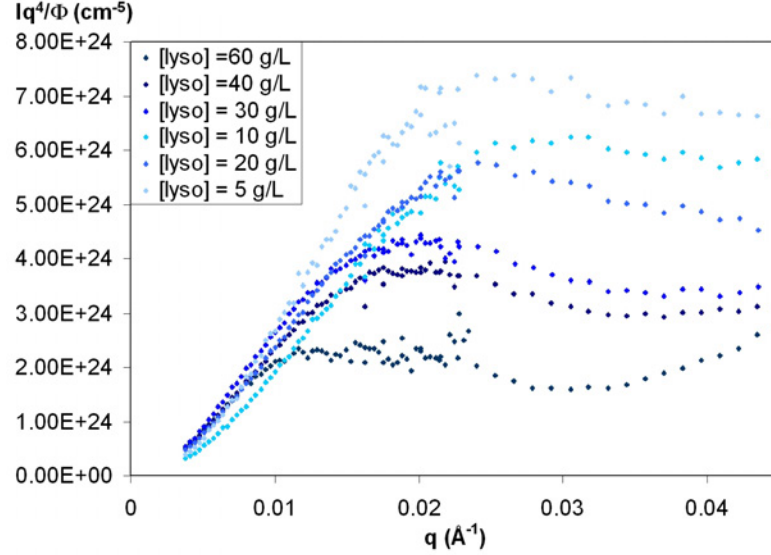


FIG. 6.15 – Représentation en $Iq^4(q)$ des signaux de protéine pour les six concentrations

	R_{prot}	σ	Φ_{prot}
$[lyso] = 5 \text{ g/L}$	55	0.45	0.20
$[lyso] = 10 \text{ g/L}$	55	0.45	0.25
$[lyso] = 20 \text{ g/L}$	75	0.4	0.27
$[lyso] = 30 \text{ g/L}$	95	0.3	0.26
$[lyso] = 40 \text{ g/L}$	145	0.31	0.24
$[lyso] = 60 \text{ g/L}$	150	0.32	0.23

TAB. 6.5 – Taille et composition interne en protéine pour les six concentrations étudiées pour le rapport de charge introduit 1.66

La figure 6.16 présente N_{prot_comp} en fonction de la concentration en protéine introduite. A basse concentration il apparaît que les complexes primaires ne contiennent que quelques dizaines de protéines et que N_{prot_comp} croît de façon pratiquement linéaire avec la concentration introduite. Cette dépendance suggère une croissance à partir d'un nombre toujours constant de germes de quelques protéines et de chaînes de PSS qui croitraient ensuite jusqu'à consommation totale des espèces. S'il est remarquable que N_{prot_comp} soit proportionnel à la concentration introduite, il reste à comprendre pourquoi une augmentation de la concentration introduite modifie la taille finie des complexes primaires. Ce point sera abordé dans la partie 6.5 de ce chapitre. On notera aussi, finalement, que la fraction volumique en protéine

dans le complexes reste entre 0.20 et 0.27 ce qui démontre que l'augmentation de la taille des complexes est due à une augmentation du nombre de protéines à l'intérieur des complexes et non un gonflement dû à la présence de solvant supplémentaire.

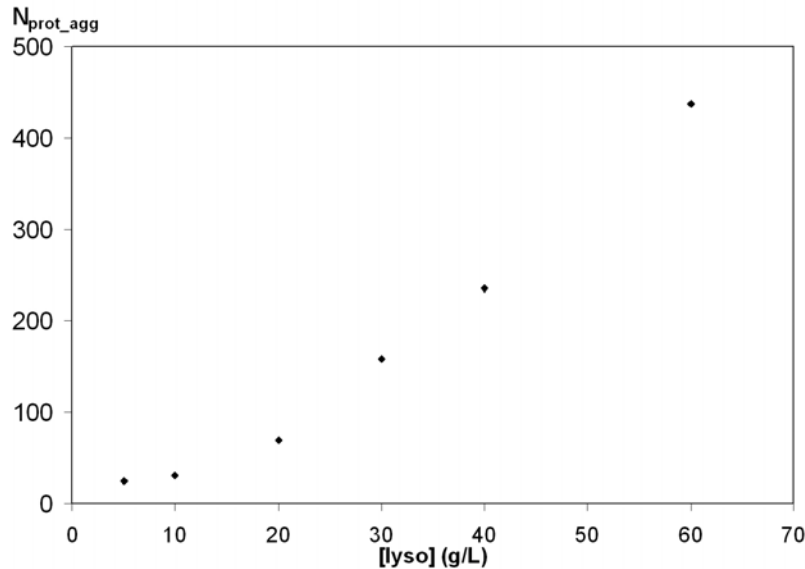


FIG. 6.16 – Nombre de protéines agrégées par complexe en fonction de la concentration totale en protéine pour $[-]/[+]_{intro} = 1.66$.

6.4 Compacité et accessibilité du coeur des complexes primaires

Nous allons dans cette partie discuter de la compacité des complexes formés. Nous avons en effet vu dans le chapitre 5 que l'ajustement des courbes de DNPA permet d'accéder à la fraction volumique de chacune des espèces au sein des complexes primaires à partir desquelles il est possible de déduire la compacité globale en fonction du pH et du taux de charge, le système étant constitué uniquement de lysozyme et de PSS. Nous allons dans un premier temps examiner la variation de la compacité avec le pH, puis, dans un deuxième temps, examiner l'accessibilité du coeur des complexes une fois ceux-ci déjà formés, par une expérience adéquate.

6.4.1 Compacité des complexes primaires en fonction des conditions initiales

Sur la figure 6.17 sont représentées les différentes compacités trouvées en fonction du rapport de charge introduit pour les trois pH étudiés et pour $f = 0.5$ et $f = 1$ à pH 4.7. La compacité est obtenue directement par sommation des fractions internes de lysozyme et de PSS déterminées dans la partie 1 pour le pH 3, le pH 4.7 ($f = 1$) et le pH 7 lorsque $[-]/[+]_{intro} < 1$. Pour les autres échantillons (pH 7 pour $[-]/[+]_{intro} > 1$ et $f = 0.5$ à pH 4.7), cette compacité est évaluée à partir de Φ_{lyso_intra} . La valeur de Φ_{PSS_intra} qu'il n'est pas possible de mesurer est estimée à partir de I_{pol}/I_{prot} . Avec cette deuxième méthode, l'erreur sur l'estimation de la compacité totale reste relativement faible pour $f = 0.5$ (pH 4.7) puisque $\Phi_{PSS_intra}/\Phi_{lyso_intra} \approx 0.25$ pour $[-]/[+]_{interne} = 1$ et très faible pour le pH 7 puisque $\Phi_{PSS_intra}/\Phi_{lyso_intra} \approx 0.15$ pour $[-]/[+]_{interne} = 1$.

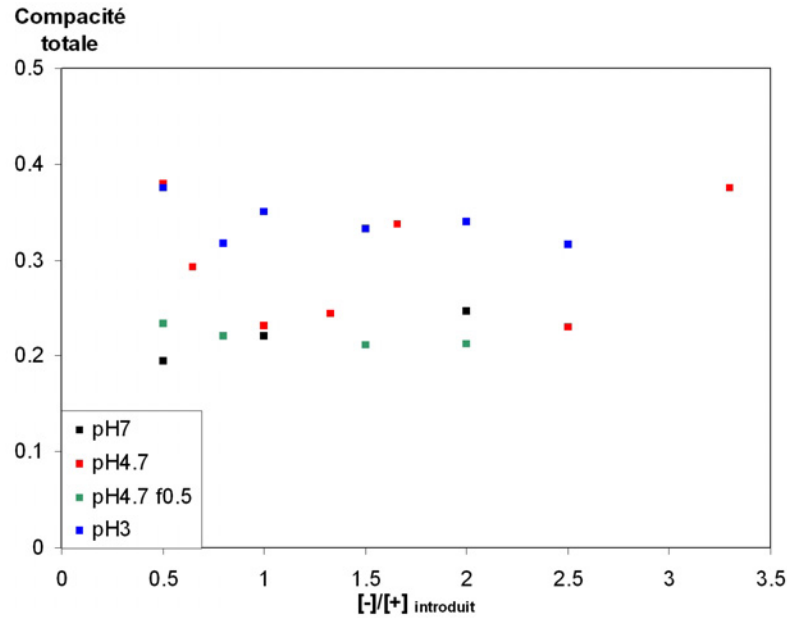


FIG. 6.17 – Compacité totale des complexes primaires en fonction du rapport de charge introduit pour les trois pH étudiés

On notera tout d'abord que cette compacité reste constante pour un pH et un taux de sulfonation donné quel que soit le rapport de charge introduit. Pour le pH 3 elle reste autour de 35%, pour le pH 7 autour de 25% ainsi que pour le pH 4.7 à $f = 0.5$. Pour le pH 4.7 enfin, la compacité est intermédiaire et se situe autour de 30% même si la variation autour de cette valeur est plus importante.

Ces valeurs de compacité sont très importantes. En effet on rappellera que le maximum possible théorique serait de 60 % environ si les protéines étaient organisées en réseau hexa-

gonal compact sans la présence des chaînes de PSS qui occupent un volume variant de 15 à 30 % de celui des protéines en fonction du pH. Or nous avons vu que ces protéines ne sont pas organisées à un ordre supérieur à deux protéines (il n'y a en effet dans les signaux de diffusion aucun pic de corrélation en dehors de celui du contact direct entre deux protéines). Le fait qu'il y ait des chaînes de polyélectrolyte enroulées autour des protéines empêche cette organisation. Le système forme des complexes très denses car les chaînes de PSS recouvrent toutes les charges positives de la protéine afin de maximiser le gain d'enthalpie électrostatique et l'expulsion maximale des contre-ions. Le gain d'entropie des contre-ions est d'ailleurs d'autant plus important que les complexes sont denses puisqu'ils gagnent de l'entropie de translation dans un espace plus important.

Les différences de compacité observées en fonction du pH pour les complexes formés de chaînes complètement chargées sont probablement liées aux charges négatives portées par les protéines (pour rappel ≈ 2 à pH 3, 8 à pH 4.7 et 10 à pH 7). Les répulsions électrostatiques locales entre ces charges négatives et les chaînes de PSS doivent légèrement pomper de l'eau de l'extérieur afin de minimiser le potentiel chimique et donc abaisser la compacité globale des complexes primaires. La compacité diminue donc à mesure que le pH augmente. De même les monomères hydrophobes présents sur les chaînes partiellement sulfonées, en se regroupant en éventuelles zones hydrophobes, doivent empêcher d'avoir un recouvrement parfait des protéines par les chaînes de PSS et abaisser la compacité des complexes, ce qui explique les différences de comportements observés à pH 4.7 entre les échantillons ayant des taux de sulfonation de 1 ou 0.5.

6.4.2 La dénaturation comme sonde

Nous avons dans un second temps voulu sonder l'accessibilité des coeurs des complexes une fois ceux-ci formés. Nous avons pour cela utilisé le phénomène de dénaturation. Ce dernier a lieu, après une étape initiale de formation des globules, pour des rapports de charge introduits supérieurs à 10. Le principe de cette expérience est donc de former des complexes en condition non dénaturante et de voir si un ajout supplémentaire de PSS à posteriori induit toujours une dénaturation ou du moins si cette dénaturation a lieu à partir du même seuil de concentration. Nous aurons de ce fait une information sur l'accessibilité des chaînes ajoutées de PSS au coeur des complexes, une fois le complexe formé. Pour réaliser cette expérience nous avons d'abord préparé une série d'échantillons à un rapport de charge introduit de 3.33 et les avons laissé reposer deux jours comme pour la mesure sans ajout, puis nous avons ajouté le PSS supplémentaire. Nous avons effectué les mesures de DNPA deux fois sur les échantillons, dans un premier temps 2 jours après l'ajout de PSS puis 9 jours après l'ajout de PSS. Les deux mesures se sont avérées être strictement reproductibles. L'équilibre était

donc atteint après l'ajout de PSS lors de l'expérience de DNPA. Nous avons choisi d'ajouter du PSS sur l'échantillon réalisé à $[-]/[+]_{intro} = 3.33$ jusqu'à obtenir des rapports de charge introduits de 8, 13 et 20 respectivement, afin qu'ils puissent être comparés directement aux spectres de diffusion de la figure 4.13. La figure 6.18 montre les courbes obtenues pour les 4 rapports de charge réalisés après ajout de PSS à postériori qui sont comparées avec les courbes obtenues lorsque toutes les chaînes de PSS sont ajoutées dans l'échantillon lors du mélange initial qui ont déjà été présentées sur la figure 4.13, et ce pour le signal de protéine (6.18 (a)) et de polyélectrolyte (6.18 (b)).

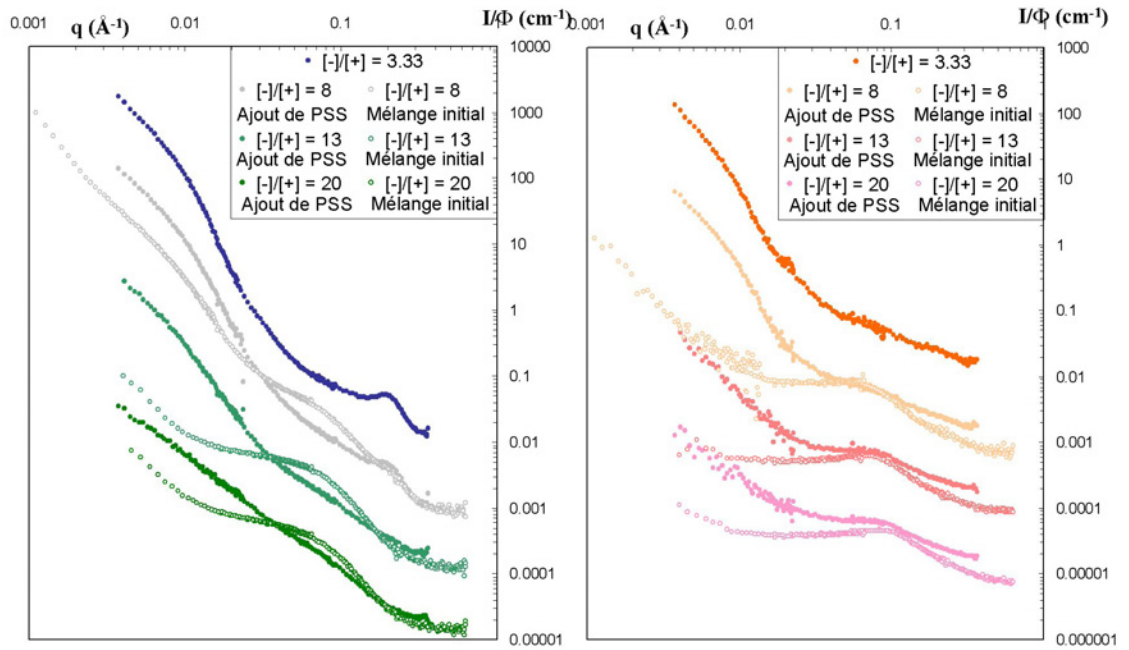


FIG. 6.18 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit en mélange initial et en ajout de PSS à postériori. (a) : courbes de diffusion de la protéine pour les quatre rapports de charge. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les quatre rapports de charge.

La superposition des courbes de mélange initial et d'ajout de PSS à un rapport de charge donné sur la figure 6.18 permet une comparaison directe des signaux obtenus. La référence est un échantillon à un rapport de charge introduit 3.33. Cet échantillon a déjà été décrit dans la partie 4.1.3 et possède les caractéristiques classiques des complexes denses vus jusqu'ici. Pour le signal de protéine un pic de corrélation à 0.2 Å^{-1} dû au contact entre protéines, à q intermédiaires une diffusion en q^{-4} due aux globules denses puis enfin une diffusion en $q^{-2.1}$ due à leur organisation à plus grande échelle. Pour le signal du polyélectrolyte on retrouve également la diffusion en q^{-4} puis en $q^{-2.1}$ des mêmes complexes primaires vus via le PSS.

Pour suivre l'évolution des échantillons vers la dénaturation, le signal de protéine est le

plus intéressant car le signal de la protéine à grands q qui passe de q^{-4} à $q^{-1.7}$ car la protéine dépliée n'a plus un comportement de sphère dense mais de chaîne à volume exclu. De plus la dénaturation provoquant une destruction des complexes primaires, la diffusion à moyens et petits q est beaucoup moins importante (de deux ordres de grandeur). Ce changement est particulièrement visible lorsque le rapport de charge dans le mélange initial est égal à 20 qui a servi à la caractérisation de la zone limpide dans le chapitre 4.

Sur la figure 6.18 (a), ce changement de diffusion à grands q n'est pas le même suivant les échantillons. Lorsque le PSS en excès a été ajouté à posteriori la diffusion à petits q chute très peu, même pour le rapport de charge 20. Pour le rapport de charge 8, le signal est très similaire au rapport de charge 3.33 lorsque le PSS est ajouté à postérieur sur toute la gamme de q alors que lorsque la mesure est réalisée sur le mélange initial, le signal présente des signes d'un début de dénaturation partielle (épaulement à q intermédiaire, abaissement du signal à petits q). Pour les rapport 13 et 20, si les signaux des mesures réalisées sur le mélange initial sont similaires et correspondent à une dénaturation de toute les protéines et à la destruction des complexes primaires, les signaux obtenus après ajout de PSS correspondent à des échantillons pour lesquels la dénaturation n'est que partielle et diffuse fortement à petits q . Cette diffusion est d'ailleurs plus importante pour le rapport de charge 13 que pour le rapport 20. Ces signaux sont très similaires à celui observé pour le rapport de charge 8 après mélange initial. La frontière de dénaturation est donc fortement décalée vers les hauts rapports de charge introduits sur le diagramme d'état.

Sur la figure 6.18 (b) sont représentées les courbes de diffusion du polyélectrolyte dans les mêmes échantillons. Ces signaux permettent d'aboutir aux mêmes conclusions que pour les signaux de protéines. Pour le rapport de charge 8, le signal reste similaire au rapport 3.33 lorsque le PSS est ajouté lors qu'il apparaît sur le signal du mélange initial un pic polyélectrolyte à q intermédiaire, ainsi qu'un très faible diffusion à petits q . Pour les rapports 13 et 20, il existe toujours de la diffusion aux petits vecteurs d'onde lorsque le PSS est ajouté à postérieur alors que les spectres réalisés sur les mélanges initiaux sont très similaires à des spectres de solutions pures de PSS. La position du pic polyélectrolyte est située à plus petits vecteurs d'onde sur les signaux des échantillons pour lesquels le PSS a été ajouté à postérieur que pour ceux du mélange initial. Le nombre de chaînes de PSS participant au réseau mixte formé avec les protéines dénaturées est donc plus faible lorsque le PSS est ajouté à postérieur, ce qui montre qu'il reste des protéines non dénaturées et que la diffusion à petits q doit provenir de complexes non détruits.

Ces mesures montrent que les complexes primaires une fois formés sont difficiles à détruire par dénaturation des protéines même pour un fort ajout d'excès de PSS. La frontière de

dénaturation est en effet fortement décalée vers les forts rapports de charge et il reste des protéines non dénaturées même lorsque le rapport de charge atteint 20 après dénaturation. En conclusion nous avons répondu à notre question : la diffusion des espèces dans le coeur des complexes primaires est en effet très limitée par la très forte compacité de ce coeur.

6.5 La longueur de Debye comme paramètre principal de la formation des complexes

Nous avons vu dans ce chapitre que le rapport de charge interne des complexes est toujours proche de 1, ce qui prouve que les interactions électrostatiques directes entre polyélectrolyte et protéines sont un acteur majeur de la complexation. Nous avons vu au chapitre 5 qu'il y a également relargage des contre-ions ce qui ajoute un gain entropique. Ces interactions directes devraient à priori mener à la formation d'agrégats de taille infinie. Nous avons également vu que les complexes primaires se forment à partir de germes de compacité fixée qui s'agrègent en objets de plus en plus gros jusqu'à atteindre une taille limite pour laquelle ils changent de mode d'agrégation pour passer en mode RLCA. Il faut donc pour expliquer la taille finie des complexes tenir compte des interactions à plus grande échelle que celle entre la protéine et le polyélectrolyte et considérer les interactions à longue distance entre les complexes primaires de la solution. Puisque nous avons vu que les complexes primaires portent des charges de surface, ces interactions à longue distance sont les répulsions électrostatiques. Il doit donc apparaître dans le système une taille d'agrégat à partir de laquelle ces interactions permettent la stabilisation des complexes primaires. Comme les interactions électrostatiquement sont fortement modulées par les écrantages dues aux ions en solution, la force ionique I doit jouer un rôle crucial sur la taille finale des complexes primaires. Nous avons cherché à mettre en rapport les tailles de complexes obtenues avec les forces électrostatiques présentes dans le système. Pour cela nous avons considéré comme paramètre principal la longueur de Debye. Cette longueur se définit comme l'inverse de la constante d'écran κ dont l'expression est la suivante :

$$\kappa^2 = \frac{2e^2 I}{\epsilon \epsilon_0 kT} \quad (6.4)$$

Avec e la charge de l'électron, ϵ la permittivité du milieu (78.5 pour l'eau), ϵ_0 la permittivité du vide, k la constante de Boltzmann et T la température.

La force ionique est initialement définie par la concentration en sel utilisé pour le tampon pH mais nous avons montré dans le chapitre 5 que les contre-ions sont éjectés des complexes.

Ils contribuent donc également à la force ionique finale du système et doivent être pris en compte. Pour connaître la force ionique apportée par la protéine, nous avons utilisé un outil en ligne sur le site internet de l'université de Virginie⁸⁹ qui propose un calcul des pKa de chaque acide aminé acide ou basique dans une protéine donnée. Ainsi pour chaque pH nous avons pu calculer et prendre en compte le nombre de charges totales portées par la protéine et non uniquement la charge effective qui est la différence entre les charges positives et négatives. Nous avons représenté dans les figures 6.19 et 6.20 le nombre de protéines par complexe N_{prot_comp} et le rayon moyen des complexes en fonction de la longueur de Debye calculée pour chacun des échantillons réalisés à pH 3 et pH 4.7 (pour un taux de charge $f = 1$) à partir de la force ionique issue du tampon et des charges portées par les espèces en solution.

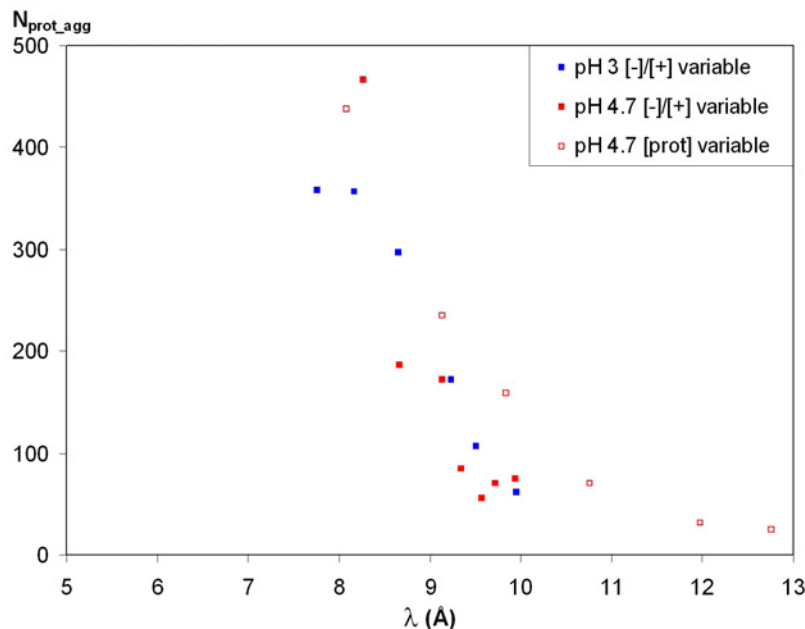


FIG. 6.19 – Nombre de protéines agrégées par complexe en fonction de la longueur de Debye.

Ces différentes courbes montrent que pour une longueur de Debye donnée, une taille finie est mesurée pour un échantillon, que son pH soit de 3 ou de 4.7 et que ce soit le rapport de charge qui varie ou la concentration totale. Ce sont donc bien les répulsions électrostatiques qui limitent la taille des complexes. Lorsque cette limite est atteinte le système change de mode d'agrégation et les complexes primaires s'arrangent ensuite en structure fractale.

Les complexes primaires se comportent donc comme des colloïdes chargés et nous avons

[89] <http://biophysics.cs.vt.edu/H++/>.

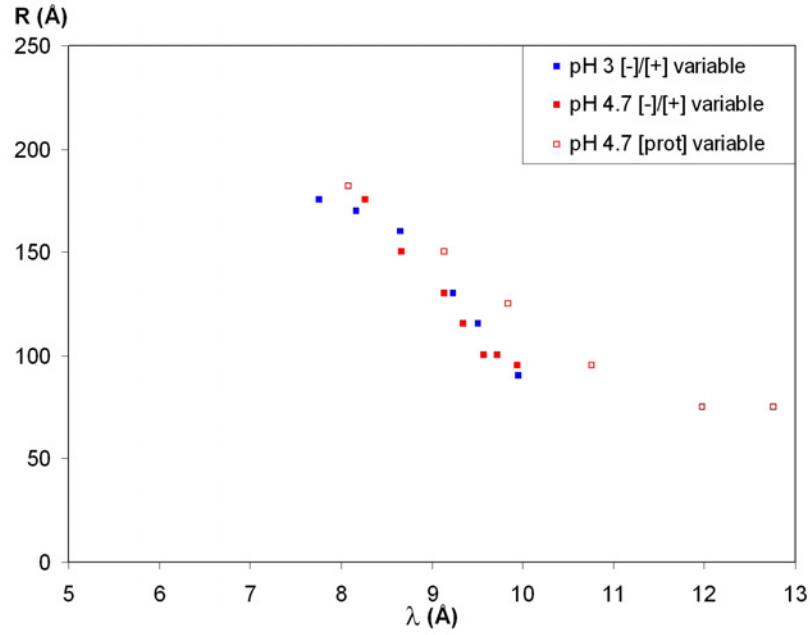


FIG. 6.20 – Rayon des complexes en fonction de la longueur de Debye

utilisé la partie électrostatique d'un potentiel de type DLVO pour caractériser les potentiels entre complexes. Le calcul de ce potentiel a été proposé par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek^{90,91,92} dans les années 40. Il considère un potentiel entre deux particules sphériques chargées V_{pp} et le solvant et les ions comme un milieu continu intervenant dans le potentiel via la constante d'écran κ décrite plus haut. La partie répulsive de ce potentiel entre deux particules de rayon a et de charge Z_p s'écrit :

$$\frac{V_{pp}(r)}{kT} = \frac{Z_p^2 L_B e^{-\kappa(r-2a)}}{r(1 + \kappa a)^2} \quad \text{pour } r > 2a \quad (6.5)$$

où L_B est la longueur de Bjerrum.

La force ionique joue un rôle très important puisqu'elle module à la fois la portée et l'intensité du potentiel électrostatique. La partie attractive du potentiel entre agrégats dans notre cas ne provient pas des forces de Van der Waals, comme dans le cas des colloïdes inorganiques chargés, car ces forces sont très faibles entre des complexes solvatés en milieu aqueux, mais entre interactions directes entre charges opposées présentes à la surface des complexes primaires. Il doit en effet rester quelques charges négatives accessibles en surface lorsque les agrégats sont positivement chargés et inversement. Cette partie attractive est

[90] Derjaguin, B. ; Landau, L. *Acta physicochim URSS* **1941**, 14, 633-662.

[91] Verwey, E. ; Overbeek, J. *Elsevier, Amsterdam* **1948**, .

[92] Israelachvili, J. *Academic press* **1992**, .

donc à courte portée. L'agrégation est donc stoppée lorsque la barrière répulsive électrostatique entre complexes de taille croissante devient suffisamment importante pour qu'ils se comportent effectivement comme un système de type colloïdes chargés. Le mode d'agrégation change alors et les complexes interagissent selon un processus de type réaction limitée, ce qui explique la dimension fractale de 2.1 observée à grande échelle. Le problème principal pour calculer précisément le potentiel est d'évaluer la charge des complexes primaires Z_{comp} . Si nous avons montré dans le chapitre 5 que cette charge est essentiellement une charge de surface, il est difficile de connaître le nombre de sites chargés accessibles en surface, d'autant plus qu'il reste quelques charges opposées à la charge globale du complexe à la surface. Les mesures de zétamétrie ne permettent pas de répondre précisément à cette question puisque ces mesures sont faites sur des agrégats de complexes primaires dont le nombre n'est pas connu avec précision. Nous pouvons néanmoins déterminer qualitativement l'effet du nombre moyen de protéines par complexe N_{prot_comp} sur l'intensité du potentiel répulsif. Puisque la charge est surfacique :

$$Z_{comp} \propto R_{comp}^2 \propto N_{prot_comp}^{2/3} \quad (6.6)$$

Le préfacteur du potentiel lié aux charges des complexes Z_{comp}^2 croît donc comme $N_{prot_comp}^{4/3}$. Il augmente donc de façon très importante lors de la croissance des agrégats, ce qui explique que la taille finie des complexes soit relativement peu polydisperse.

Nous présentons sur la figure 6.21 des calculs de l'intensité du potentiel électrostatique pour des complexes de taille $R_{comp} = 100 \text{ \AA}$ (avec $\Phi_{lyso_intra} = 0.25$), une force ionique de tampon de 50 mM à pH 4.7. Les figures 6.21 (a) et 6.21 (b) considèrent une concentration constante de lysozyme (40 g/L) et des rapports de charge croissant correspondants aux échantillons de la partie 6.3.1 et les figures 6.21 (c) et 6.21 (d) des concentrations croissantes de lysozyme et de chaînes de PSS (pour un $[-]/[+]_{intro} = 1.66$ constant) correspondants aux échantillons de la partie 6.3.2 à pH 4.7.

Pour évaluer Z_{comp} , nous avons considéré que seules les protéines (ou les chaînes de PSS interagissant avec ces protéines) situées au voisinage de la surface N_{prot_surf} participent à la charge du complexe primaire. N_{prot_surf} est calculé comme suit :

$$N_{prot_surf} = 4/3\pi((R_{comp}^3) - (R_{comp} - R_{prot})^3)\Phi_{intra}/V_{prot} \quad (6.7)$$

L'apport d'une protéine à la charge globale Z_{comp} va être liée au nombre de charges de la protéine dissociées exposées à l'extérieur du complexe kZ_{prot} ou Z_{prot} est la charge globale d'une protéine et k un préfacteur quantifiant le nombre de charges exposées. D'où :

$$Z_{comp} = kZ_{prot}N_{prot_surf} \quad (6.8)$$

En considérant une répartition relativement homogène des charges sur la protéine, k est nécessairement inférieur à 0.5 puisque seule la moitié des charges est exposée à l'extérieur. En pratique, ce nombre est probablement beaucoup plus faible puisqu'une partie importante des charges à la surface des protéines interagissent avec les espèces de charges opposées. Les figures 6.21 (a) et 6.21 (c) présentent des calculs réalisés avec $k = 0.2$ et les figures 6.21 (b) et 6.21 (d) présentent des calculs réalisés avec $k = 0.5$.

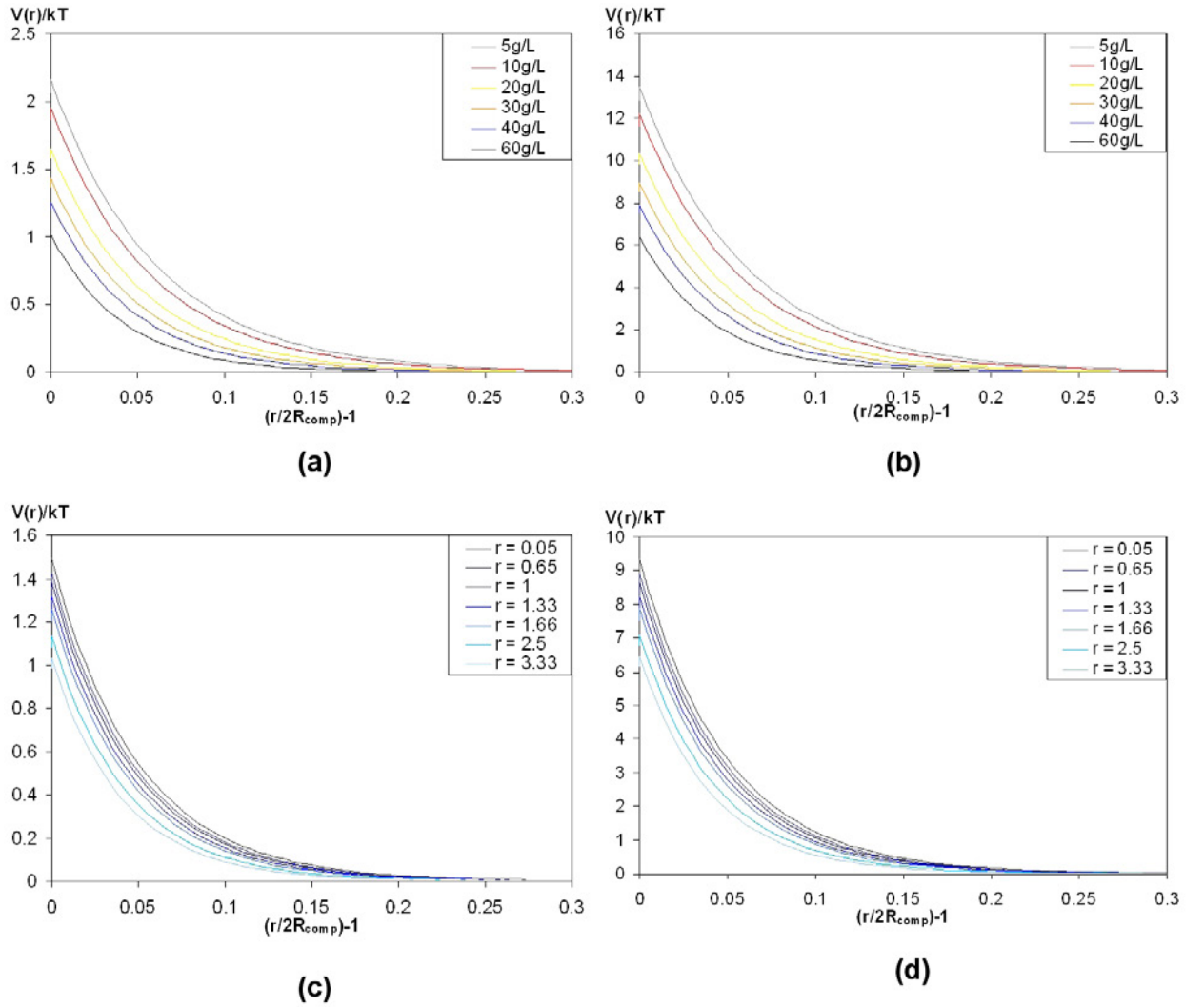


FIG. 6.21 – Potentiels en fonction de la distance entre objets. Taille des objets fixée à 100 Å. (a) et (b) : en fonction de la concentration en protéine. (c) et (d) : en fonction du rapport de charge.

Nous avons choisi de représenter le potentiel en fonction de $r/2R_{comp} - 1$ de telle sorte

que $r = 0$ corresponde aux contact de 2 complexes primaires et que $r = 1$ corresponde à une distance égale à un diamètre de complexe. Les valeurs de l'intensité en $r = 0$ correspondent donc à l'énergie maximale qu'il faut fournir au système pour obtenir un rayon de 100 Å. Ces énergies décroissent fortement avec une augmentation du rapport de charge à concentration en protéine constante ou de la concentration en matière introduite (du fait de l'augmentation effective de force ionique) et montre qu'il est beaucoup plus difficile de faire des agrégats de taille importante pour une faible concentration initiale en produits ou lorsque le rapport de charge est faible, en accord avec les résultats expérimentaux de la partie 6.3. Les valeurs de potentiels des figures 6.21 (b) et 6.21 (d) montrent que k est très inférieur à 0.5 car l'énergie à fournir au système pour obtenir des tailles caractéristiques du système sont de l'ordre de 8 à 15 kT ce qui est assez élevé. Par contre lorsque $k = 0.2$ ces valeurs chutent autour de 2 à 5 kT ce qui est beaucoup plus raisonnable pour les tailles que nous voulons atteindre.

6.6 Résumé

L'étude des interactions électrostatiques sur les globules denses a permis de déterminer les propriétés suivantes :

- le rapport de charge interne des complexes reste toujours autour de 1 et ce quel que soit le rapport de charge introduit et la densité de charge sur les objets. De plus les complexes formés pour un rapport de charge introduit supérieur à 1 possèdent tous une couronne de polymère.

- les globules ont une très forte densité lorsque la densité de charge est maximale sur le polyélectrolyte et la protéine.

- la taille finie des globules est limitée par les répulsions électrostatiques de surface. Le mécanisme de formation de la structure finale est en deux temps : tout d'abord la formation des globules qui croissent jusqu'à leur taille limite puis leur agrégation (voir figure 6.22).

De plus nous avons montré au travers de l'essai de formation de complexes avec la napine que ce modèle peut être étendu à des systèmes constitués d'autres espèces.

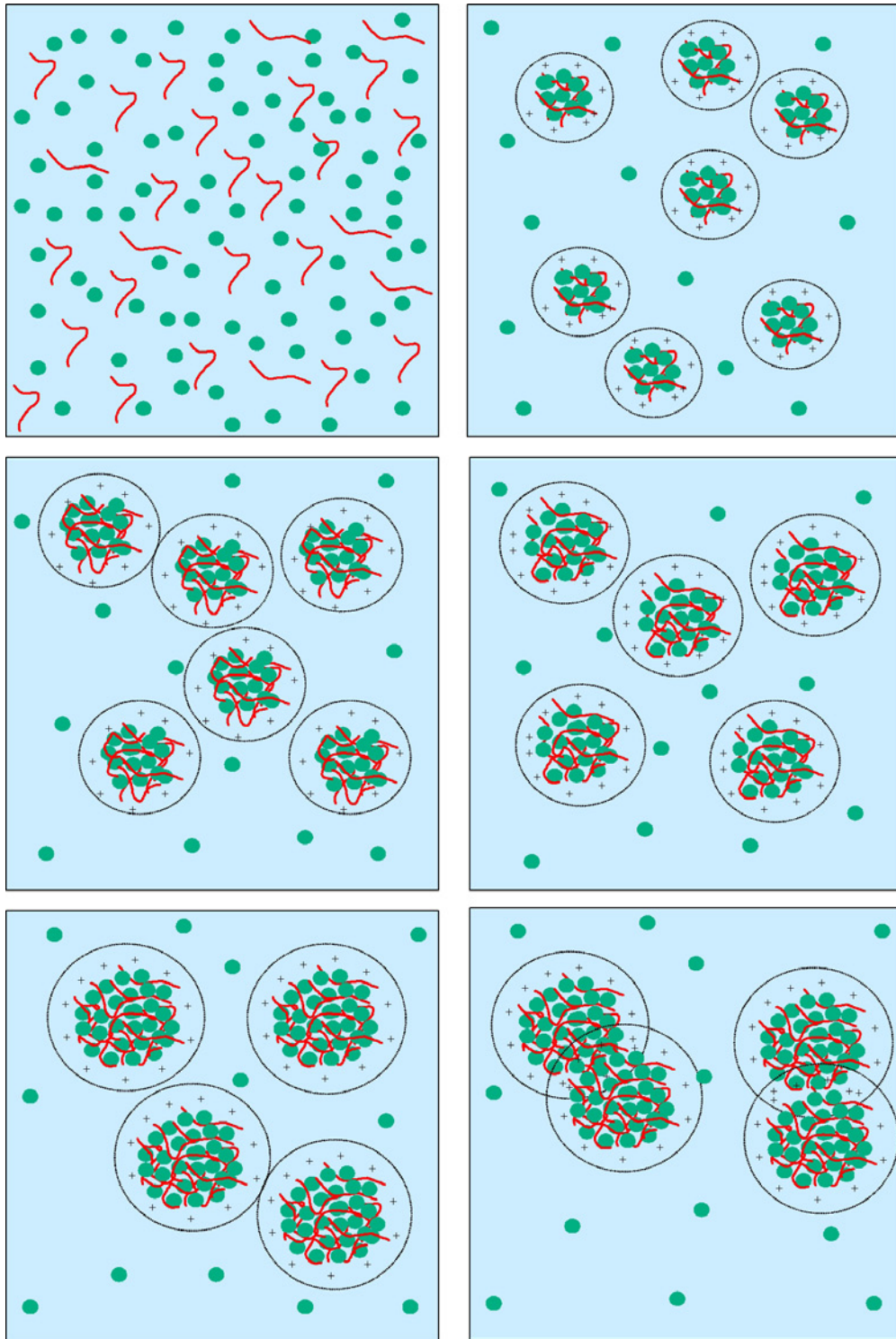


FIG. 6.22 – Schéma de formation des globules denses. Ordre chronologique de haut en bas et de gauche à droite. L'exemple montre un rapport de charge introduit inférieur à 1.

Chapitre 7

Modulation des interactions électrostatiques par la force ionique

Comme nous venons de le voir dans les chapitres précédents, les interactions électrostatiques jouent un rôle crucial dans la formation des différentes structures possibles. Ces structures générales sont au nombre de trois : (i) un gel macroscopique correspondant à un réseau de polyélectrolyte en régime semi-dilué réticulé par les protéines, (ii) des globules denses avec une stoechiométrie de charge interne et (iii) une solution mixte de chaîne de PSS et de lysozyme dénaturé. Les processus menant à chacune de ces trois structures sont directement liés aux forces électrostatiques :

- le rapport entre les charges apportées par la protéine et le polyélectrolyte détermine si la protéine est dénaturée ou non.

- la force ionique du milieu fixe une longueur de persistance pour les chaînes de PSS en présence de protéine et ainsi détermine une limite entre un régime dilué qui mène à des globules denses et un régime semi-dilué qui mène à un gel.

- si le système forme des globules denses, leur taille est la même à une force ionique donnée.

Pour mieux comprendre ces effets électrostatiques, il restait un paramètre évident à faire varier : la force ionique I du solvant. Nous avons également voulu sonder les possibilités de réorganisation des structures en faisant varier la force ionique à posteriori.

7.1 Structure obtenue en fonction de la force ionique initiale

Dans cette première partie, nous allons sonder l'influence de la force ionique initiale sur la formation de complexes avec des chaînes de PSS de différentes tailles. Notre choix s'est porté sur des chaînes de $N = 600$ et $N = 100$ monomères afin d'être assez loin des cas extrêmes vus dans les chapitres précédents. En effet des tailles de chaîne de $N = 600$ permettent d'être assez proche de la transition gel-globule pour la force ionique référence ($5 \cdot 10^{-2}$ M) et les chaînes de $N = 100$ ne forment pas des complexes trop denses comme nous l'avons vu dans le chapitre 3. Nous pourrions ainsi déterminer si le système peut changer de structure en fonction de la salinité.

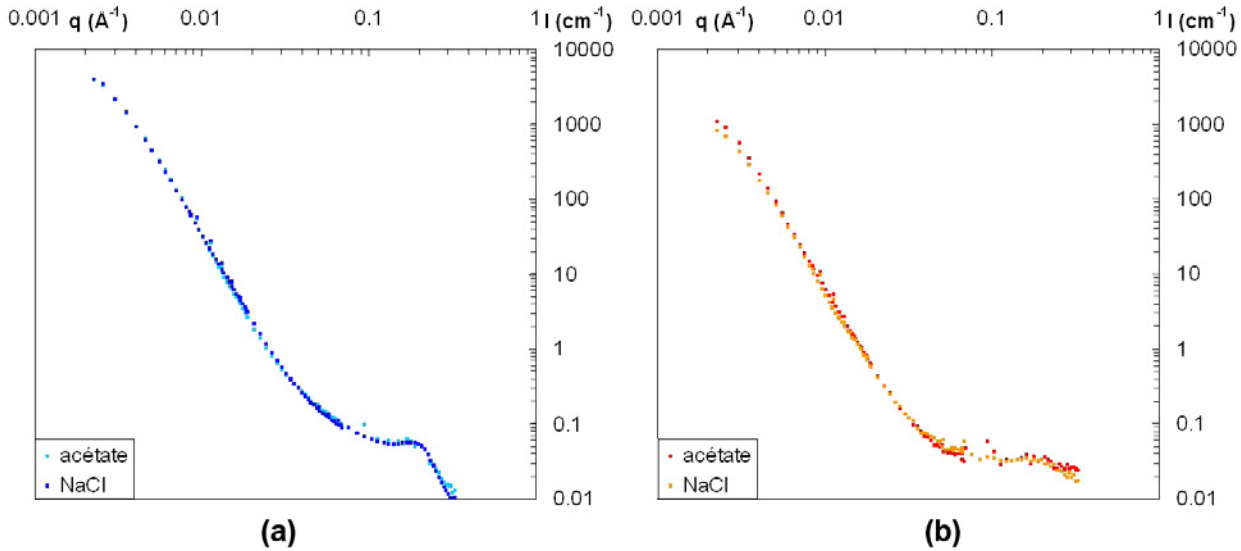


FIG. 7.1 – Comparaison entre les courbes de diffusion d'un échantillon avec $N = 100$, $I = 5 \cdot 10^{-1}$ M et $[-]/[+]_{intro} = 3.33$ avec force ionique fixée par les ions NaCl ou acétate.

La **force ionique initiale** du solvant sera fixée entre $5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-1}$ M. Pour la fixer nous avons utilisé entre $5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-2}$ M un tampon directement à la concentration voulue comme force ionique; pour les forces ioniques supérieures le tampon a été fixé à $5 \cdot 10^{-2}$ M et la force ionique supérieure a été ajustée par ajout de NaCl, ceci dans le but de ne pas introduire trop d'hydrogène dans la solution, ce qui risquerait de modifier le contraste neutronique. Nous avons vérifié sur deux échantillons ($N = 100$ et $N = 600$ à $5 \cdot 10^{-1}$ M pour $[-]/[+]_{intro} = 3.33$) que le rôle du contre-ion sur la structure est négligeable puisque les spectres réalisés soit avec NaCl soit à partir d'un tampon tout acétate à $5 \cdot 10^{-1}$ M sont très proches (voir figure 7.1). Rappelons qu'il est possible de préparer des solutions mères de lysozyme concentrées avec NaCl loin des concentrations limites de cristallisation données

par le diagramme de phase établi par Riaux-Kautt⁹³.

7.1.1 Pour des chaînes longues

Sur la figure 7.2 sont représentées les courbes de diffusion pour des échantillons formés avec des chaînes de PSS de taille $N = 600$ monomères. Chacun de ces échantillons a été préparé à un pH fixé à 4.7, un rapport de charge introduit $[-]/[+]_{intro} = 3.33$ et avec un solvant qui éteint soit le signal de la protéine soit le signal du polyelectrolyte.

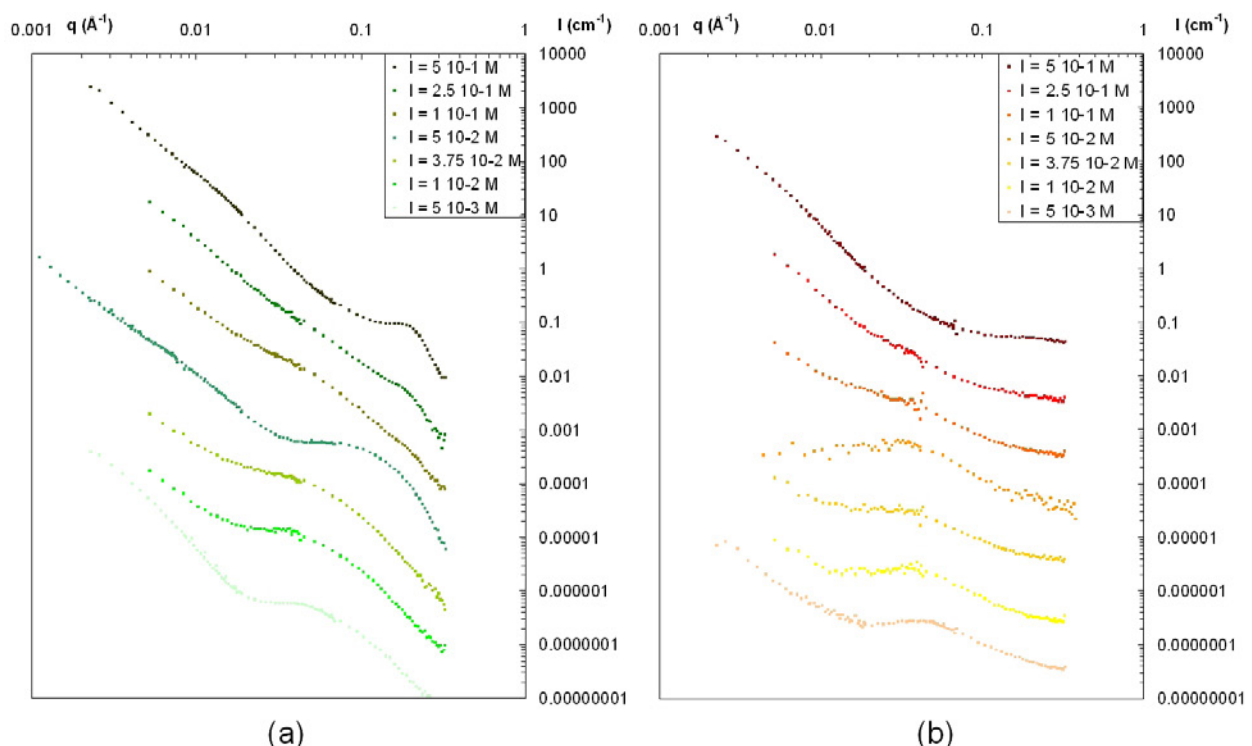


FIG. 7.2 – Courbes DNPA de complexes à chaînes de PSS de taille $N = 600$ en fonction de la salinité pour un rapport de charge introduit de 3.33 et pour pH= 4.7. (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les sept salinités décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyelectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les sept salinités séparées d'un facteur 10.

Les signaux obtenus (figure 7.2 (b)) forment un ensemble saisissant : **la gamme de salinité permet de parcourir toute la gamme des trois types de structures observées.**

Pour la salinité la plus élevée ($5 \cdot 10^{-1}$ M), la structure obtenue présente globalement les caractéristiques des signaux de globules denses mais alors que le pic de corrélation à 0.2

[93] Ries-Kautt, M. ; Ducruix, A. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 745-748.

\AA^{-1} est inchangé, des différences apparaissent à petits q : la pente à q intermédiaire est comprise entre 3 et 4, ce qui est dû au fait que les globules sont peu denses et ont une grosse rugosité de surface. Cette pente ne permet de faire un ajustement du signal avec un modèle de globule. Les globules obtenus après contraction de chaînes longues sont donc moins denses que ceux obtenus avec des chaînes courtes. La pente à petits q ne correspond pas à une organisation fractale liée à une agrégation de type RLCA. On peut par contre imaginer une densification des zones concentrées en protéines organisées en $q^{-2.5}$ à petits q (cf chapitre 4).

Pour le signal du polyélectrolyte on retrouve également cette diffusion importante à petits q en $q^{-2.5}$ comme celle la protéine ; il y a en même temps perte du réseau polyélectrolyte comme le montre la disparition du pic polyélectrolyte. Nous préciserons la structure exacte obtenue en 7.4.

Les deux salinités suivantes ($2.5 \cdot 10^{-1}$ M et $1 \cdot 10^{-1}$ M) aboutissent à la formation d'une structure hybride entre les structures observées à $5 \cdot 10^{-1}$ et $5 \cdot 10^{-2}$ M. On observe une extinction progressive du pic de corrélation jusqu'à aboutir la structure gel pour la salinité de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Cette structure est caractérisée par un signal de facteur de forme de protéine à grands q et une diffusion en $q^{-2.5}$ à petits q . Le signal du polyélectrolyte lui voit son intensité à petits q légèrement chuter mais il continue de suivre la même décroissance que le signal de la protéine. Cela veut donc dire que la structure formée ici est toujours globulaire mais que les chaînes commencent à retrouver une longueur de persistance plus élevée ce qui réduit fortement la densité des globules. A $5 \cdot 10^{-2}$ M, le pic polyélectrolyte est retrouvé.

Enfin dès la salinité de $3.75 \cdot 10^{-2}$ M et jusqu'à $5 \cdot 10^{-3}$ M on voit que la structure formée est le réseau mixte de chaînes :

- la diffusion à grands q de la protéine passe de q^{-4} à $q^{-1.7}$ ce qui montre qu'elle est dénaturée.
- à petits q l'intensité diffusée est beaucoup moins importante.

Le réseau polyélectrolyte apparu à $5 \cdot 10^{-2}$ M reste visible mais un point intéressant à noter ici est la position du pic polyélectrolyte. On peut voir qu'il se déplace à plus grands q lorsque la salinité baisse. Ce déplacement du pic ne peut provenir que de l'interaction des chaînes avec les protéines (les variations de l_p dues uniquement au changement de sel sont trop faibles pour en être l'origine). Or nous avons vu dans le chapitre 4 que le réseau de polyélectrolyte est fortement contracté en présence de protéine native mais peu contracté en présence de protéine dénaturée. C'est d'ailleurs ce qui est observé pour $5 \cdot 10^{-3}$ M. Il est donc probable que pour les salinités intermédiaires ($3.75 \cdot 10^{-2}$ et $1 \cdot 10^{-2}$) il reste une fraction de protéines

non dénaturées qui diminue lorsque la force ionique diminue. La limite de dénaturation est de plus cohérente avec les limites trouvées dans les diagrammes de phase. En effet elle était pour des chaînes de taille $N = 700$ à un rapport de charge introduit de 4 pour une salinité de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Ici nous voyons qu'elle est à 3.33 pour une salinité de $3.75 \cdot 10^{-2}$ M.

7.1.2 Pour des chaînes courtes

Sur la figure 7.3 sont représentées les courbes de diffusion pour des échantillons formés avec des chaînes de PSS de taille $N = 100$ monomères. Les conditions de formation des échantillons sont les mêmes que pour les chaînes longues que nous venons de voir, soit un pH fixé à 4.7, un rapport de charge introduit $[-]/[+]_{intro} = 3.33$ et un solvant qui éteint soit le signal de la protéine soit le signal du polyélectrolyte. La force ionique du tampon a été fixée entre $5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-1}$ M. Nous présentons pour cette taille de chaînes moins de courbes car il y a moins de cas différents.

En effet pour les deux plus grandes salinités ($5 \cdot 10^{-1}$ M et $5 \cdot 10^{-2}$ M), le système adopte la même structure, celle des globules denses : pic de corrélation à 0.2 \AA^{-1} , décroissance en q^{-4} , changement de pente à plus petits q ; ces caractéristiques sont retrouvées pour le signal du polyélectrolyte. Pour $5 \cdot 10^{-1}$ M on peut voir que pour le cas de ces chaînes courtes, le sel a pour effet d'augmenter fortement la taille des complexes primaires : le changement de pente intervient à plus petits q . Ainsi les complexes formés sont beaucoup plus gros. L'ajustement des courbes n'est pas possible mais le rapport I_{pol}/I_{prot} nous permet de déterminer le rapport de charge interne qui reste proche de 1. Nous voyons en effet sur la courbe (c) de la figure 7.3 que ce rapport d'intensité, bien que légèrement croissant du fait de la présence d'une couronne de polyélectrolyte, permet une bonne estimation du rapport de charge interne. La valeur de ce rapport au début de la croissance est de 0.13, ce qui donne un rapport de charge interne de 1.6 pour un rapport introduit de 3.33. Il est probable que ceci provienne de la densité des globules. Puisqu'ils sont moins denses que pour $N = 40$, une partie des chaînes peut atteindre le coeur.

Pour la salinité la plus faible ($5 \cdot 10^{-3}$ M), nous obtenons un changement de structure : la disparition du pic inter-protéines à 0.2 \AA^{-1} , la loi en $q^{-1.7}$ signalent la dénaturation du lysozyme ; le signal du PSS est celui d'un réseau de chaînes. Toutefois, le signal de la protéine à petits q est toujours important, contrairement au signal du PSS, comme dans le cas des gels. Il y a donc coexistence de structures. En résumé pour des chaînes de 100 unités, la même succession globules-gel- réseau mixte est observée mais la structure gel apparaît plus fugitivement.

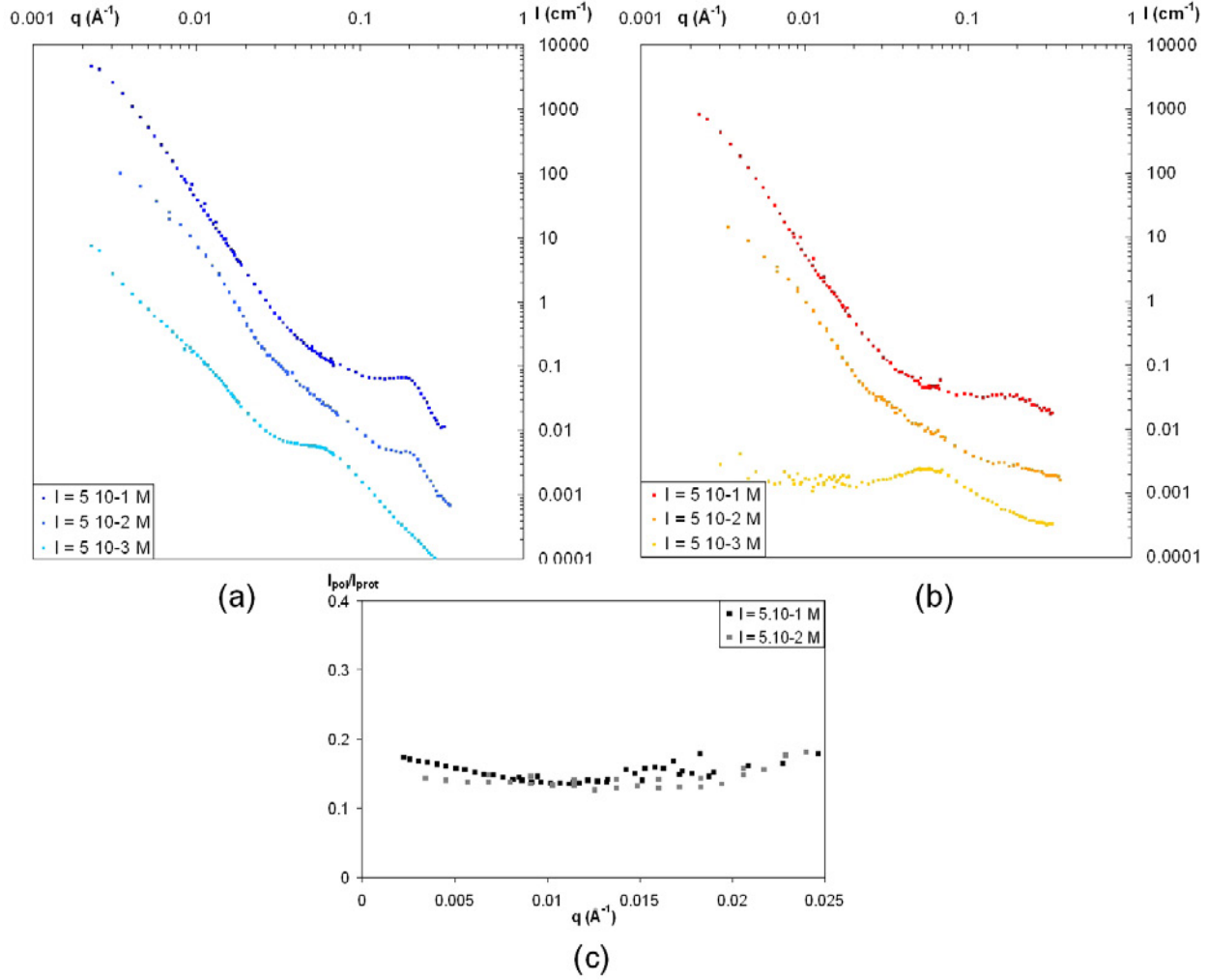


FIG. 7.3 – Courbes DNPA de complexes à chaînes de PSS de taille $N = 100$ en fonction de la salinité pour un rapport de charge introduit de 3.33 et pour $\text{pH} = 4.7$. (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les trois salinités décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyelectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les trois salinités séparées d'un facteur 10.

7.1.3 Trois structures accessibles par la salinité

Comme nous venons de le voir, les trois structures caractérisées depuis le début de l'étude, à savoir le gel, les globules denses et le réseau mixte de chaînes sont susceptibles d'être atteintes via un changement de salinité. Et ce grâce à deux changements de structures dûs à deux phénomènes différents.

Prenons la cas de chaînes de taille élevée qui forment une structure de type gel à 5.10^{-2} M, il est possible de faire passer le système de la structure gel à la structure globule dense en augmentant la salinité. Ce phénomène s'explique très facilement. Nous avons en effet vu lors des chapitres précédents que le système forme des globules denses si la concentration en polyélectrolyte passe du régime semi-dilué au régime dilué après son interaction avec la protéine, ce changement de régime étant dû à un changement de longueur de persistance de la chaîne. La longueur de persistance peut être abaissée par une augmentation de la salinité ou par l'interaction des chaînes de PSS avec les protéines.

Le second phénomène qui apparaît avec une baisse de salinité cette fois est la dénaturation de la protéine malgré un rapport de charge introduit inférieur à la limite déterminée. Nous venons en effet d'observer que lorsque la salinité passe sous une valeur de $3.75.10^{-2}$ M, la protéine est dénaturée par le polyélectrolyte. L'explication que l'on peut fournir pour ce phénomène est que cette baisse de salinité induit des interactions plus fortes entre la protéine et le polyélectrolyte. Ainsi si le polyélectrolyte est plus solidement collé aux protéines, il peut plus aisément faire interagir ses zone hydrophobes avec la protéine et donc la déplier.

7.2 Etude détaillée de la transition gel-globule

Nous avons voulu étudier en détail la transition de la structure globulaire à la structure gel via l'ajout de sel. Ceci pour voir si une structure globulaire peut être obtenue lorsque du sel est ajouté sur une structure gel déjà formée.

Pour cela nous avons effectué deux séries d'échantillons : une première en incluant tout le sel lors de la préparation des échantillons, et une deuxième où le sel est introduit en deux temps. Nous avons choisi d'utiliser des chaînes les plus longues possibles pour sonder ces effets de transition globule-gel, notre choix s'est porté sur des chaînes de taille $N = 800$.

7.2.1 Par la force ionique initiale : transition due à un changement de l_p

La figure 7.4 donne les signaux de protéine pour les quatre salinités étudiées entre 5.10^{-2} M et 5.10^{-1} M. Cette salinité a été fixée dès la préparation des solutions avant mélange. Il

s'agit d'un tampon acétate à $5 \cdot 10^{-2}$ M auquel à été ajouté du sel NaCl pour atteindre la salinité souhaitée. Nous nous sommes placés à un rapport de charge introduit de 3.33.

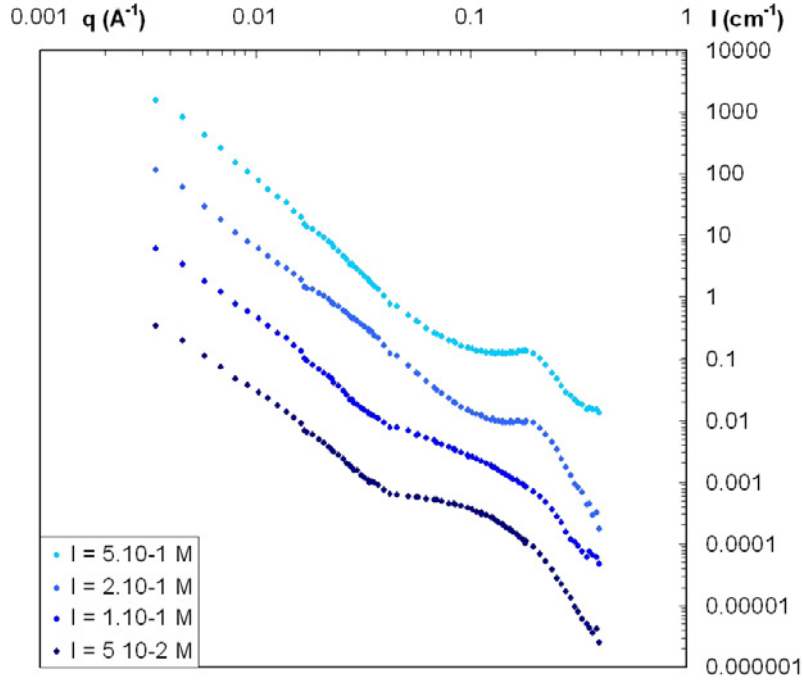


FIG. 7.4 – Courbes DNPA de complexes à chaînes de PSS de taille $N = 800$ en fonction de la salinité initiale pour un rapport de charge introduit de 3.33 et pour $\text{pH} = 4.7$. Courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les quatre salinités décalées d'un facteur 10.

La salinité la plus basse ($5 \cdot 10^{-2}$ M) a déjà été présentée sur la figure 4.2.2 et permet d'observer que la structure formée est le gel. Le signal de la protéine est en effet celui de son facteur de forme suivi aux plus petits q d'une remontée en $q^{-2.5}$. Pour cette salinité, la longueur de persistance n'est pas assez abaissée pour le réseau polyelectrolyte disparaisse et que les globules denses soient formés. En effet, pour cette taille de chaîne ($N = 800$), la valeur de c^* calculée avec une longueur de persistance de 20 \AA , (valeur obtenue dans la partie 4.2.3.2 en présence de protéine) est de 0.08 M , valeur inférieure à la concentration utilisée lors de l'expérience.

Le fait d'augmenter la salinité initiale du système permet d'accéder à cette structure globulaire. On voit en effet que pour une salinité de $1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ la structure ne change pas trop même si on peut entrevoir un épaulement émerger vers 0.2 \AA^{-1} . Par contre dès la salinité de $2 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ atteinte, la structure passe définitivement du gel aux globules denses. Le pic de corrélation à 0.2 \AA^{-1} est cette fois bien marqué et la diffusion aux petits angles beaucoup plus importante. La transition est donc atteinte pour une valeur de salinité proche de $1 \cdot 10^{-1}$

M. Même si l'abaissement de la longueur de persistance est à priori faible quand la salinité passe de 5.10^{-2} à 1.10^{-1} M, il est suffisant pour que le système change de régime. Pour que c^* des chaînes de 800 monomères soit de 0.1 M, il faut que la longueur de persistance soit de 17 Å, valeur proche de celle de la longueur évaluée à 5.10^{-2} M (20 Å). Ce résultat confirme les observations sur les chaînes de 600 unités (paragraphe 7.1.1) avec l'avantage supplémentaire d'une transition gel-globules plus rapide et donc mieux déterminée.

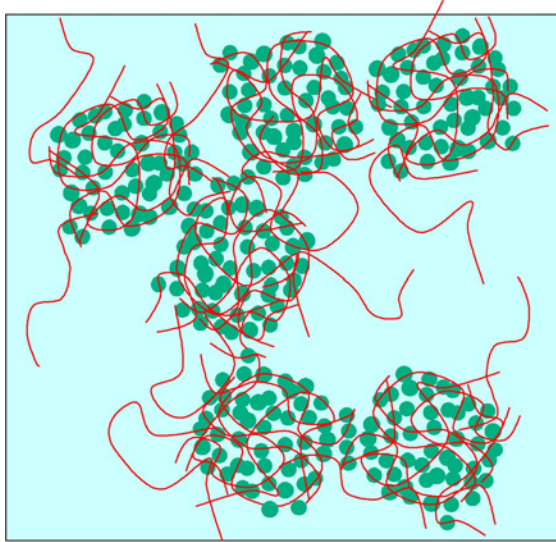


FIG. 7.5 – Représentation schématique de la structure globulaire pour des chaînes longues.

Ces complexes formés à partir de chaînes longues sont toujours trop peu denses pour permettre un ajustement de la courbe. Il faut noter de plus que même pour la salinité de 5.10^{-1} M aucun changement de pente dans le signal à petits q n'est visible, changement de pente qui devrait être dû à l'agrégation des complexes primaires. Il n'est pas possible de dire à priori si les complexes primaires ont une taille trop élevée pour voir le changement de pente ou si l'agrégation à grande échelle des complexes primaires que nous avons vu jusque là a bien lieu pour ce système. Cependant la limite du signal étant à 0.003 Å^{-1} , cela veut dire que ces complexes ont au moins un rayon de 500 Å. De plus l'intensité observée à plus petits q (1000 cm^{-1}) est légèrement plus faible que celle observée dans le cas des chaînes courtes (2000 cm^{-1} environ). Cela signifie donc que les globules formés ont une compacité moindre en protéine. Puisque les chaînes sont longues, il est probable qu'une chaîne participe à plus d'un complexe primaire. Ils resteraient ainsi liés par une ou plusieurs chaînes, ce qui permettrait pas l'agrégation de type RLCA et donnerait un exposant de diffusion plus élevé à petits q . Les complexes seraient donc beaucoup moins denses en périphérie et liés sous forme de gel avec des zones denses en chaînes et des zones peu denses. Le résultat d'une telle structure est schématisé sur la figure 7.5. Nous allons dans les parties suivantes tout

d'abord vérifier cet effet lors d'un ajout de sel après formation des complexes puis essayer de déterminer plus précisément la structure obtenue en mesurant la conformation moyenne des chaînes.

7.2.2 Par le sel ajouté à posteriori

Afin de vérifier les possibilités de réorganisation des complexes formés, nous avons étudié des échantillons formés avec les mêmes chaînes ($N = 800$) le même rapport de charge et les mêmes salinités que dans la partie 7.2.1, mais dans lesquels la salinité finale a été obtenue en ajoutant du sel à posteriori sur des échantillons d'abord formés à une salinité de 5.10^{-2} M.

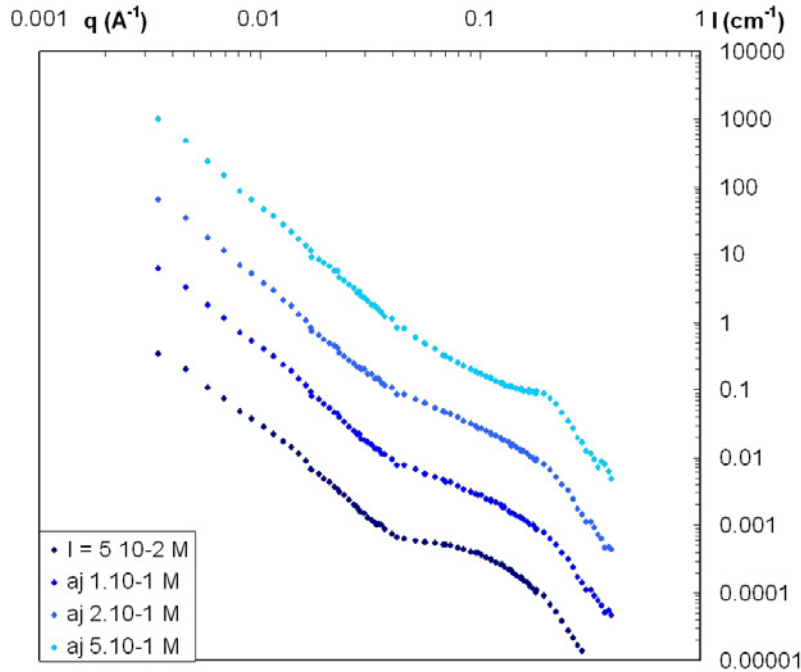


FIG. 7.6 – Courbes DNPA de complexes à chaînes de PSS de taille $N = 800$ en fonction de la salinité ajoutée pour un rapport de charge introduit de 3.33, un $\text{pH} = 4.7$ et une salinité initiale de 5.10^{-2} M. Courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les quatre salinités décalées d'un facteur 10.

On peut alors comparer la figure 7.6 (salinité ajoutée à posteriori) à la figure 7.4. On observe que la transition gel-globules denses est décalée de 2.10^{-1} M à 5.10^{-1} M. Ainsi le système a la possibilité de se réorganiser mais il est nécessaire d'apporter une force ionique supérieure pour le faire transiter vers la structure globulaire.

Alors qu'il semble à priori difficile de casser la structure de type gel caractérisée au chapitre 4 en ajoutant du sel à posteriori, la structure finale est très similaire à celle obtenue

à la même salinité en une seule étape (cf 7.2.1). Ceci peut s'expliquer par la répartition hétérogène des protéines dans le gel. La DNPA nous montre en effet que les protéines forment des zones denses dans un gel homogène de chaînes de PSS (remontée aux petits q du signal protéine). Lors de l'ajout de sel, ces zones denses peuvent s'effondrer du fait de la forte réduction de la longueur de persistance des parties de chaînes n'interagissant pas avec les protéines pour former le gel de complexes primaires présenté en 7.2.1.

7.2.3 Conformation des chaînes dans les globules

Nous avons décrit en 4.2.3 la conformation des chaînes de PSS dans le mélange protéine-polyélectrolyte. Ces mesures ont été rendues possibles par le fait que le polyélectrolyte hydrogéné et la protéine possèdent la même densité de longueur de diffusion. Ainsi il est possible d'effectuer une expérience de variation de concentration en PSSd pour extraire le facteur de forme des chaînes. Nous avons au chapitre 4 décrit les résultats pour la structure gel. Nous considérons ici la conformation des chaînes de PSS dans une structure globulaire formée à partir de chaînes longues à forte salinité. Nous venons de voir que les chaînes de PSS se trouvent majoritairement dans des zones denses en protéine et en chaînes. Cette structure est très proche de celle des globules denses obtenus avec les chaînes courtes (chapitres 5 et 6).

Nous avons dans un premier temps mesuré les signaux de protéine et de polyélectrolyte avec les chaînes considérées ($N = 800$) dans les solvants usuels (100% D_2O et 43% D_2O / 57% H_2O) à une salinité de 5.10^{-1} M. Ces courbes sont représentées dans la figure 7.7. Les courbes (a) et (b) représentent les signaux de protéine et de polyélectrolyte respectivement. La structure obtenue est bien celle de globules denses comme en atteste la présence d'un pic à 0.2 \AA^{-1} pour le signal de protéine, pic également retrouvé sur le signal du polyélectrolyte. La diffusion à plus petits q pour le deux signaux est ensuite proche de q^{-4} , décroissance due aux complexes primaires. Nous noterons également qu'on n'observe pas de polyélectrolyte libre malgré le fait que le rapport de charge introduit soit de 3.33. Comme nous venons de le voir en 7.2.1, ces signaux ne sont pas ajustables avec notre modèle du fait de la faible compacité et de la taille très grande des complexes primaires. Il est cependant possible d'utiliser le rapport I_{pol}/I_{prot} (figure 7.7 (c)) : il est très peu croissant aux petits q ce qui permet d'estimer le rapport de charge interne sans être gêné par un signal de couronne. La valeur $I_{pol}/I_{prot} = 0.35$ est très élevée car elle aboutit à un rapport de charge interne de 2.56 au lieu des valeurs proches de 1 trouvées jusqu'ici pour les globules denses. Ceci s'explique par la faible compacité des globules : si la fraction volumique en protéines y est faible, il est possible que des chaînes de PSS n'aient pas toutes leurs charges collées aux protéines, comme dans le cas des gels. Ceci est cohérent avec le fait que nous n'observons pas de polyélectrolyte

libre. La conformation des chaînes de PSS à l'intérieur de ces globules moins compacts ne sera donc pas celle des chaînes dans les globules denses de chaînes courtes même si elle en est proche.

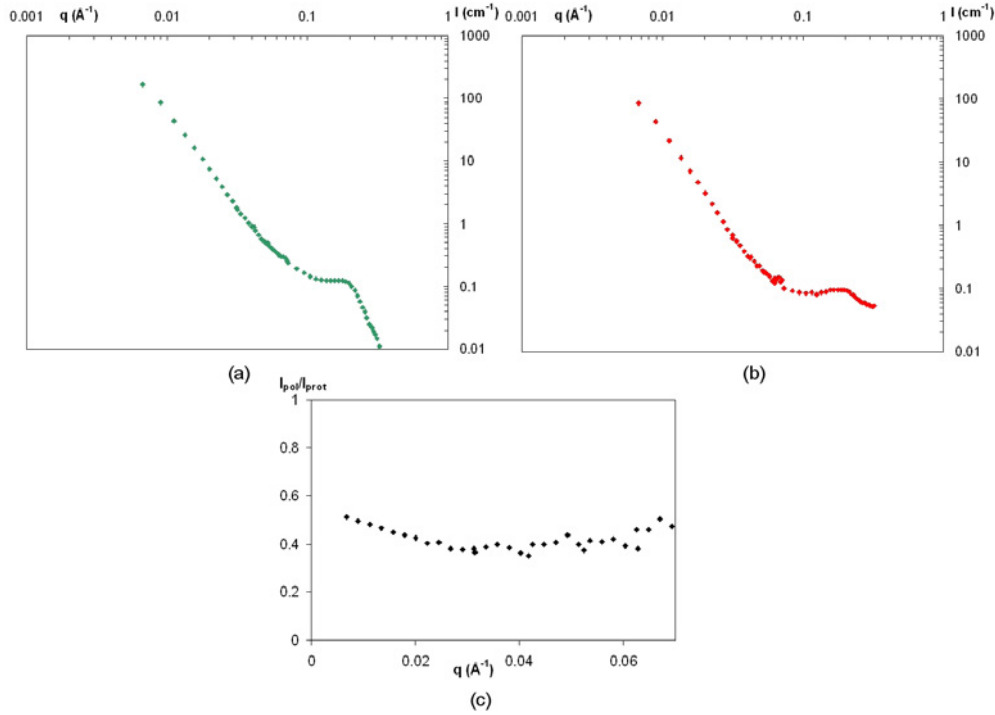


FIG. 7.7 – Courbes DNPA d'échantillons à chaînes de PSS de $N = 800$ à une salinité de $5 \cdot 10^{-1}$ M pour un rapport de charge introduit de 3.33. (a) : courbe de diffusion de la protéine. (b) : courbe de diffusion du polyélectrolyte. (c) : rapport des intensités I_{pol}/I_{prot} à petits q .

Décrivons maintenant la conformation des chaînes à partir de leur facteur de forme. Afin d'obtenir ce facteur de forme, nous avons comme dans le chapitre 4 préparé 4 échantillons à taux de chaînes deutériées variable dans un solvant 43% D₂O / 57% H₂O. Ceci afin d'extrapoler la limite à 0% de chaîne deutériées, le signal d'une chaîne isolée (tout le détail de cette expérience peut être trouvé en section 4.2.3). Les quatres courbes aux différents taux de chaînes deutériées ainsi que la courbe extrapolée à concentration nulle donnant le facteur de forme de la chaîne de PSS sont représentées sur la figure 7.8.

On observe sur cette courbe que l'extrapolation à concentration nulle permet bien d'effacer toute contribution due à des interactions inter-chaînes. En effet le pic de corrélation à 0.2 Å^{-1} disparaît progressivement, de même que le trou de corrélation qui lui est associé. La diffusion à très petits q voit aussi son intensité diminuer de façon importante (un facteur 10). On observe que les courbes (représentées ici en I/Φ) se croisent et ont toutes la même intensité pour une valeur de q de 0.02 Å^{-1} . Ceci nous permet d'ores et déjà de dire que cette valeur sera la plus précise que nous aurons et que donc l'intensité absolue du facteur

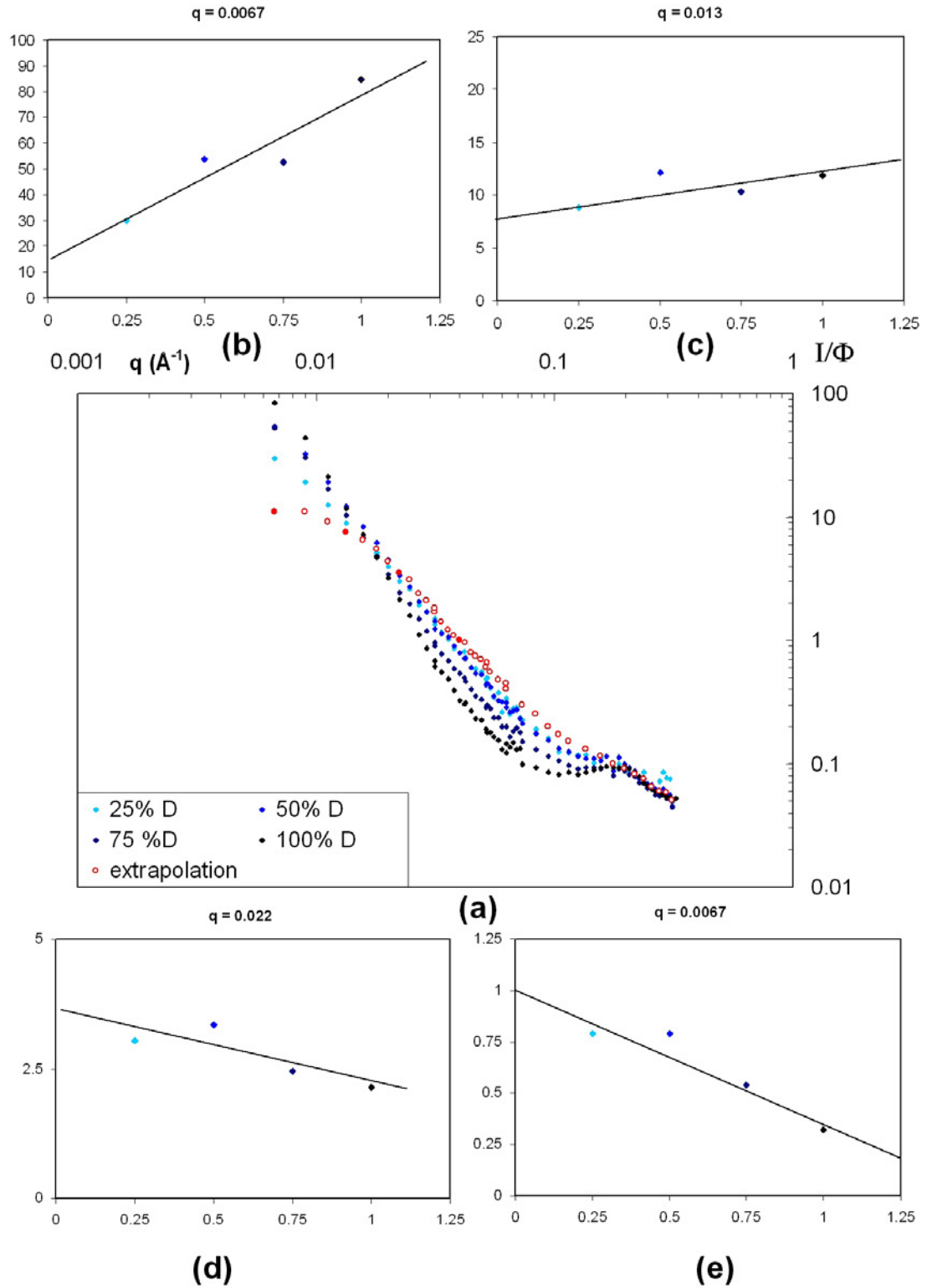


FIG. 7.8 – Figure (a) : courbes de diffusion en I/ϕ et extrapolation du facteur de forme pour le PSS dans les complexes. Courbes (b) à (e) : exemples d'extrapolation pour quatre valeurs de q .

de forme à petits q sera bien déterminée. Afin de mieux visualiser ce facteur de forme nous l'avons représenté en représentation de Kratky ($Iq^2 = f(q)$). La figure 7.9 montre ce facteur de forme comparé à ceux mesurés précédemment du PSS seul et du PSS dans les complexes à structure gel.

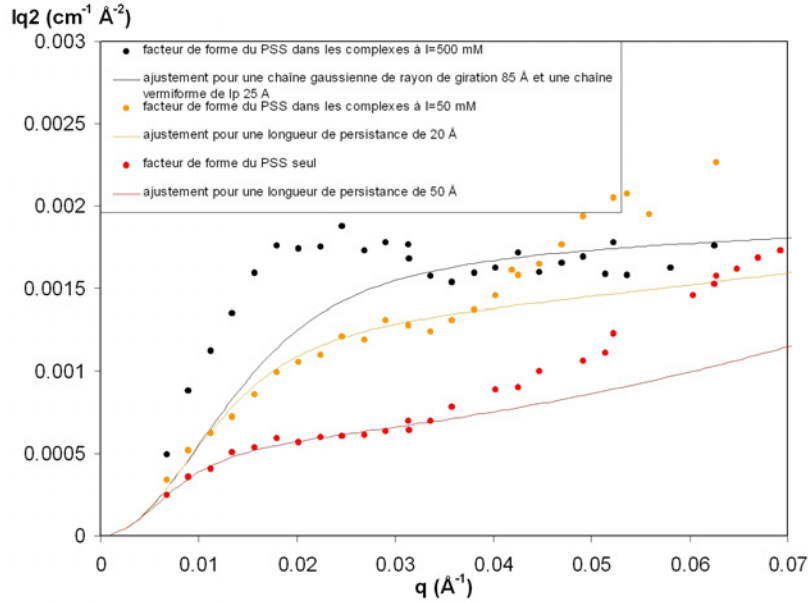


FIG. 7.9 – bla

Une comparaison directe des trois courbes montre que la conformation adoptée par les chaînes de PSS à l'intérieur des globules denses n'est pas du tout la même que celle adoptée par le PSS seul ou dans la structure gel. En effet dans ces deux cas nous avons utilisé un modèle de chaîne vermiculaire. La seule différence entre les deux ajustements venait de la longueur de persistance, qui se voyait drastiquement réduite à l'intérieur de la structure gel. Dans le cas présent des globules la conformation est différente : on observe un plateau en (Iq^2), signe donc d'une diffusion en q^{-2} . Cet exposant suggère que les chaînes sont proches d'une chaîne gaussienne et suivent une marche aléatoire au sein des globules.

Ajustement du facteur de forme mesuré

Imaginons comment les chaînes de PSS peuvent adopter une conformation gaussienne au sein d'un globule dense avec une concentration forte en protéine : le schéma 7.10 représente un globule dense formé à forte salinité avec des chaînes de PSS longues. Du fait de la présence des protéines, le volume interne ne sera pas entièrement accessible pour les chaînes, à la différence d'une chaîne seule en solution. La chaîne aura donc un "rayon de giration effectif" dans le globule supérieur à son rayon de giration en solution soit, pour $N = 800$, 57\AA .

Sur ce schéma nous avons représenté en rouge une chaîne de PSS de taille $N = 800$

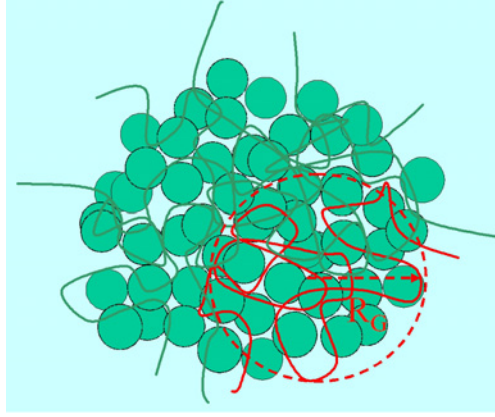


FIG. 7.10 – Représentation schématique de la conformation d'une chaîne longue dans un globule.

isolée à l'intérieur d'un complexe comprenant plusieurs chaînes et des protéines. Nous avons représenté son rayon de giration effectif R_g , plus petit que la taille du complexe, mais d'une taille quand même égale à plusieurs dizaines d'Angströms. Ce rayon de giration effectif sera le paramètre principal pour ajuster le facteur de forme de la chaîne dans le globule. Il n'est néanmoins pas évident à estimer de premier abord. Pour le faire nous avons considéré le rapport de charge interne déterminé via le rapport des intensités à petits q des signaux de polyélectrolyte et de protéine I_{pol}/I_{prot} que nous avons estimé à 2.5. On peut ensuite estimer donc qu'une chaîne à 800 monomères chargés va toucher un nombre de protéines N tel que :

$$N = \frac{N_{mono}}{Z_{prot} \cdot [-]/[+]_{intra}} \quad (7.1)$$

avec N_{mono} le nombre de monomères de la chaîne, Z_{prot} la charge de la protéine et $[-]/[+]_{intra}$ le rapport de charge interne.

Dans ce cas nous obtenons $N = 30$ protéines. Le volume associé est ensuite dépendant de la compacité en protéine :

$$V_{occup} = \frac{N \cdot V_{prot}}{\Phi_{prot}} \quad (7.2)$$

avec V_{prot} le volume d'une protéine et Φ_{prot} la fraction volumique en protéine. Celle-ci étant plus faible que celle des globules denses du chapitre 6 qui donnent des valeurs comprises entre 0.2 et 0.25, nous l'avons donc arbitrairement fixée à 0.15.

Le rayon de giration R_g est ensuite directement tiré de la valeur de V_{occup} :

$$R_g = \sqrt[3]{\frac{3V_{occup}}{4\pi}} \quad (7.3)$$

Nous obtenons $R_g = 85 \text{ \AA}$ environ. Cette valeur est ensuite utilisée pour modéliser le signal. Le modèle est le facteur de forme d'une chaîne gaussienne, dont l'expression est bien connue :

$$P(q) = \frac{2(e^{-X} - 1 + X)}{X^2} \text{ avec } X = q^2 R_g^2 \quad (7.4)$$

Afin de tenir également compte des chaînes situées dans les couronnes nous avons utilisé un modèle mixte avec une conformation gaussienne pour les chaînes dans les complexes et une conformation de chaîne vermiforme pour les chaînes dans les couronnes. Pour rappel le modèle de chaîne à longueur de persistance s'écrit :

$$P(q) = \frac{2(\exp(-x) + x - 1)}{x^2} + \left[\frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left(\frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) \exp(-x) \right] \frac{2l_p}{L} \quad (7.5)$$

avec $x = \frac{Lq^2 l_p}{3}$, L étant la longueur de la chaîne et l_p sa longueur de persistance. Cette expression est valable tant que $ql_p < 4$. Elle permet d'ajuster toute la partie de la courbe située aux petits vecteurs d'onde. Lorsque $ql_p > 4$ alors le signal de diffusion suit une loi asymptotique :

$$P(q) = \frac{\pi}{qL} + \frac{2}{3q^2 L l_p} \quad (7.6)$$

Le pourcentage de chaînes libres et dans les couronnes est également évalué via $[-]/[+]_{intra}$ et a été estimé à 23%. **Le modèle final est donc une combinaison linéaire chaîne gaussienne-chaîne vermiforme pondérée par ce pourcentage de chaînes considérées dans la couronne.** La longueur de persistance l_p que nous avons prise est de 50 \AA , valeur obtenue pour les chaînes seules à cette salinité (chapitre 4)

L'ajustement final est montré sur la courbe 7.9. On peut voir qu'il modélise bien le plateau à grands q du signal expérimental en unités absolues avec le jeu de paramètres calculés. Ainsi la valeur de R_g trouvée est cohérente et donc le modèle de la chaîne de PSS en conformation gaussienne à l'intérieur des globules denses schématisée sur la figure 7.10 peut être considéré comme réaliste. Il n'a cependant pas été possible de modéliser le signal dans le domaine des petits q . Le plateau en q^{-2} s'étend en effet jusqu'à $\approx 0.02 \text{ \AA}^{-1}$. Pour ajuster la forme de cette partie de la courbe avec une chaîne gaussienne, il faudrait utiliser un R_g effectif de quelques centaines d'Angströms et dans ce cas la valeur de l'intensité du plateau serait complètement fautive. Nous avons également tenté de modéliser le signal des chaînes en considérant des modèles de chaînes gaussiennes de sphères ou de chaînes gaussiennes de coquilles dans lesquels les chaînes décorent des sphères monodisperses (de rayon égal à celui de protéine) formant une chaîne aléatoire mais tous ces modèles se sont révélés infructueux.

Si notre modèle donne une vision qualitative de la conformation des chaînes dans les globules en accord avec les mesures, la conformation exacte de la chaîne reste à comprendre.

7.3 Modulation de la taille finie des globules denses

Nous avons montré dans le chapitre 6 que la valeur de la taille finie des globules denses s'explique par la force ionique de la solution, force ionique issue à la fois du tampon et des charges et contre-ions des chaînes de PSS et du lysozyme. Cette conclusion nous a donc amené à essayer de moduler la taille de ces globules en faisant varier la salinité. Nous avons pour cela choisi une taille de chaîne la plus petite possible ($N = 40$) afin d'être toujours dans le régime globules, et afin qu'ils soient les plus denses possible. Dans ce cas, nous pourrions ajuster les courbes et en extraire tailles caractéristiques et compacités.

7.3.1 Par la force ionique initiale

Nous avons dans un premier temps déterminé l'effet de la salinité initiale sur les complexes. La figure 7.11 montre les spectres obtenus pour trois salinités initiales différentes dans le contraste protéine et le contraste polyélectrolyte pour un rapport de charge initial de 3.33. On notera que les courbes pour la salinité $5 \cdot 10^{-2}$ M ont déjà été montrées et décrites dans les chapitres 4 et 5 et servent ici de références.

Les caractéristiques principales des différentes courbes présentées ici sont celles typiques des signaux de globules denses. On observe dans tous les cas le pic à 0.2 \AA^{-1} sur les signaux de protéine et une réminiscence de ce pic sur les signaux de polyélectrolyte. De même le signal à petits q pour les deux signaux suit une loi en q^{-4} puis en $q^{-2.1}$.

Les courbes montrent une augmentation conséquente de la taille des complexes lorsque la salinité augmente. En effet la valeur de q à laquelle la pente change de loi de décroissance est décalée vers les petits q lorsque la salinité augmente. Pour $I = 5 \cdot 10^{-2}$ M, le rayon est tellement augmenté qu'on ne voit plus le changement de pente. L'ajustement avec le modèle des globules denses présenté sur la figure 7.11 pour le signal des protéines n'est pas parfait. Les courbes expérimentales sont en effet assez bruitées et donc seule une estimation de la taille et de la compacité a été possible. Néanmoins nous pouvons dire que la compacité globale des globules denses reste du même ordre de grandeur lorsque la salinité est augmentée, soit aux alentours de 30%, tandis que le rayon des globules passe de 130 à 150 puis 300 \AA . Les complexes formés sont donc beaucoup plus gros à forte force ionique.

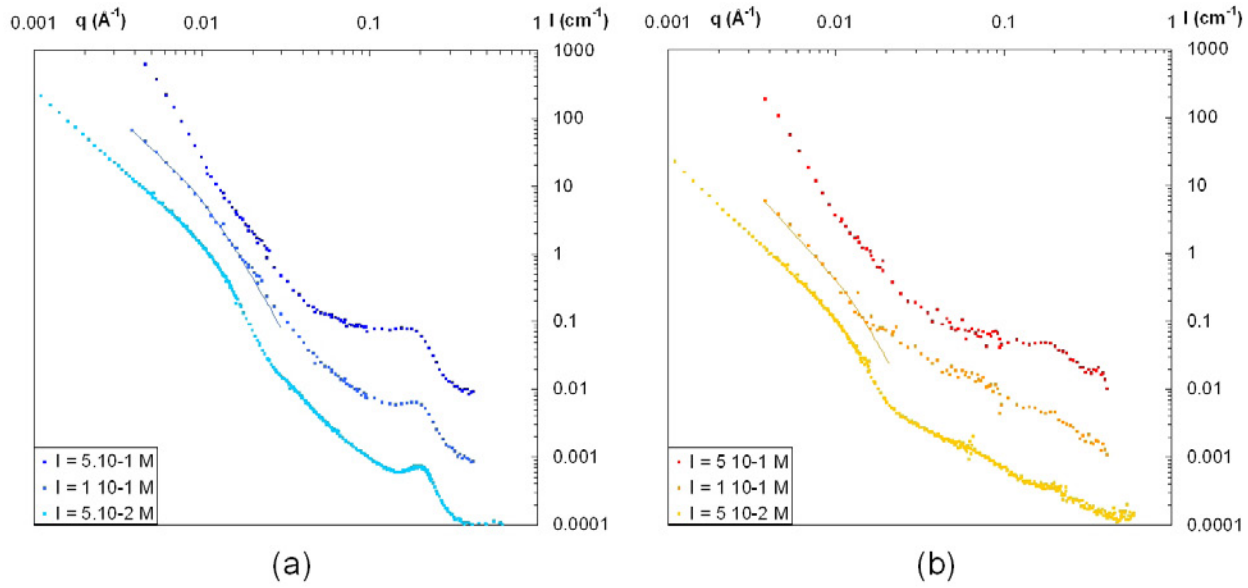


FIG. 7.11 – Courbes DNPA de complexes à chaînes de PSS de taille $N = 50$ en fonction de la salinité initiale pour un rapport de charge introduit de 3.33 et pour $\text{pH} = 4.7$. (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les trois salinités décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les trois salinités séparées d'un facteur 10.

7.3.2 Par le sel ajouté à posteriori

Une fois les effets de la salinité initiale sur la taille des globules déterminés, nous avons voulu sonder si cet effet était le même pour une salinité initiale et pour une salinité ajoutée à posteriori, afin de connaître les capacités de réorganisation des complexes comme pour le cas de la transition gel-globule. Nous avons donc utilisé les chaînes de PSS de taille $N = 40$ à un pH de 4.7 et un rapport de charge introduit de 1.66. La salinité a été fixée à 5.10^{-2} M pour la formation des complexes puis des ajouts ont été effectués pour la faire augmenter jusqu'à 5.10^{-1} M. La figure 7.12 montre les courbes de diffusion obtenues pour ces quatre salinités dans le contraste protéine et le contraste polyélectrolyte.

On peut observer via les signaux de polyélectrolyte et de protéine une belle progression de courbes : la taille des objets augmente très progressivement. En effet que ce soit pour la protéine ou le polyélectrolyte, le changement de pente entre le q^{-4} et le $q^{-2.1}$ intervient à plus petits q lorsque la salinité augmente. Ce changement de taille est plus facilement observable via une représentation en $Iq^4 = f(q)$ sur laquelle le passage d'une décroissance à l'autre est plus marqué. La figure 7.13 montre les courbes de signal de protéine dans cette représentation.

On y voit très bien que le pic se déplace vers les plus petits q lorsque la salinité augmente,

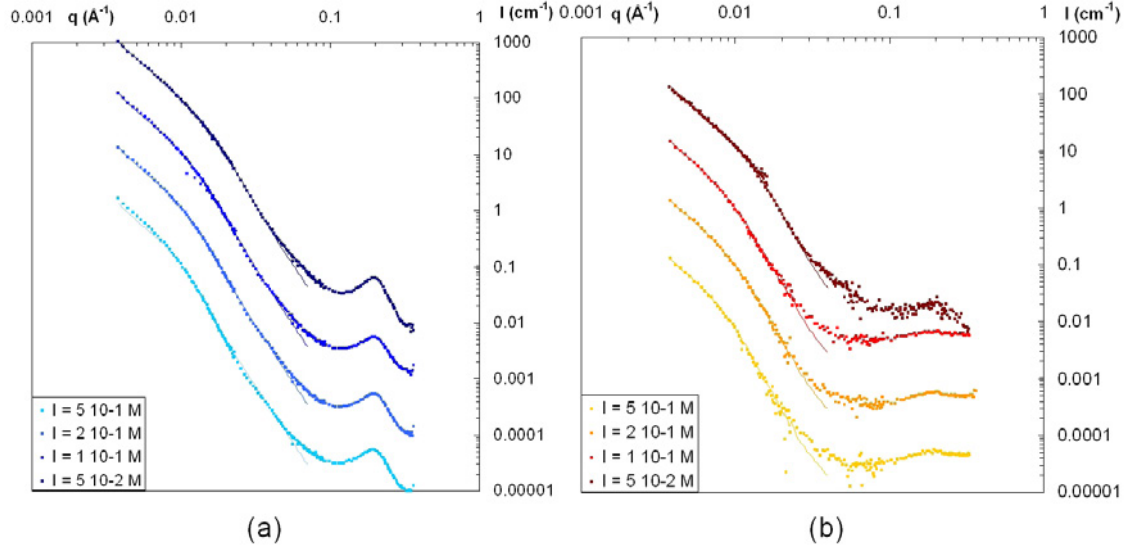


FIG. 7.12 – Courbes DNPA de complexes à chaînes de PSS de taille $N = 50$ en fonction de la salinité ajoutée à posteriori pour un rapport de charge introduit de 1.66 et pour $\text{pH} = 4.7$. (a) : courbes de diffusion de la protéine (extinction du signal du PSS dans un solvant 100% D_2O) pour les quatre salinités décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte (extinction du signal du lysozyme dans un solvant 43% D_2O / 57% H_2O) pour les quatre salinités séparées d'un facteur 10.

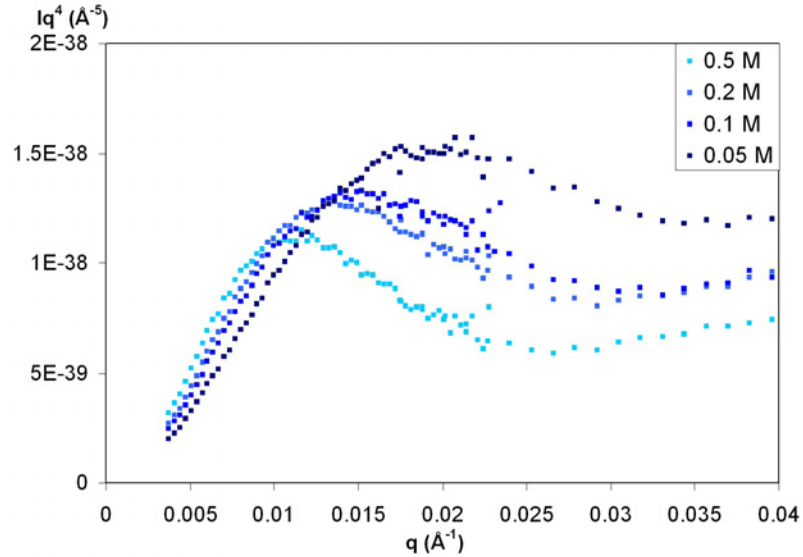


FIG. 7.13 – Représentation en $Iq^4(q)$ des courbes de sel ajouté pour le signal de protéine

et que donc la taille du rayon augmente. Elle suit la même évolution que pour l'augmentation de la salinité initiale. Cependant ici la salinité a été ajoutée à posteriori : le changement de taille des complexes primaires nécessite donc qu'une réorganisation ait eu lieu dans la structure qui était déjà formée. L'ajustement des courbes (valeurs dans le tableau 7.1) montre que **la compacité reste la même dans les complexes primaires entre les complexes initiaux et ceux obtenus après ajout de sel**. La réorganisation ne se fait donc pas au sein même des complexes primaires mais sur des échelles supérieures puisque seule la taille change par une modification des interactions électrostatiques.

	R_{prot}	R_{pol}	σ	Φ_{prot}	Φ_{pol}	$[-]/[+]_{interne}$
$I = 5.10^{-2}$ M	70	100	0.4	0.24	0.055	1.03
$I = 1.10^{-1}$ M	130	160	0.4	0.25	0.057	1.02
$I = 2.10^{-1}$ M	145	170	0.4	0.26	0.061	1.08
$I = 5.10^{-1}$ M	178	200	0.35	0.25	0.055	1

TAB. 7.1 – Rayon des globules, fractions volumiques internes et rapport de charge interne en fonction de la salinité ajoutée à posteriori

Par ailleurs la structure finale obtenue est proche de celle obtenue si le sel avait été présent directement à la formation des complexes. L'effet est le même mais les tailles sont moins décalées. Ceci est représenté sur la figure 7.14 qui présente le rayon obtenu en fonction de la salinité. La valeur de la taille finie des globules est donc peu dépendante de l'histoire.

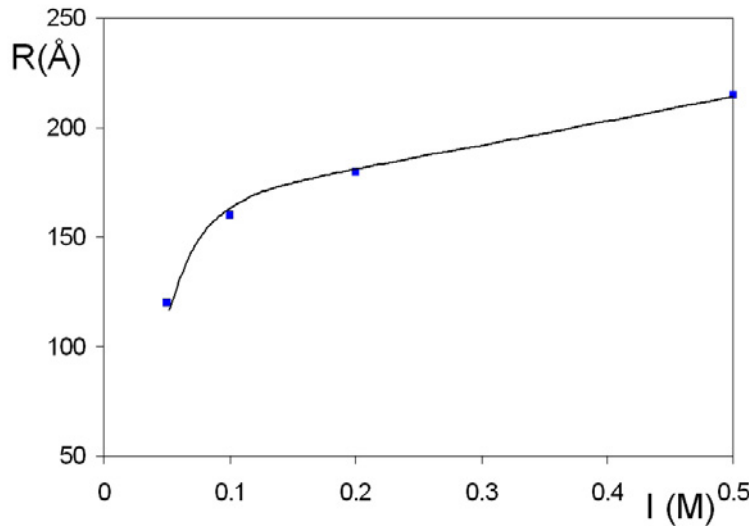


FIG. 7.14 – Rayon moyen du globule en fonction de la force ionique dans le cas du sel ajouté.

7.3.3 Comparaison avec les tailles obtenues dans le chapitre 5

Le fait que les valeurs de taille finie des globules soit peu dépendante de l'histoire suggère que la l'ajout de sel ne modifie que les interactions électrostatiques entre complexes primaires, en accord avec le modèle d'agrégation limitée par les répulsions croissantes entre complexes présentées en 6.5. Ainsi si ce modèle est valide, les tailles obtenues devraient être toujours fonction de la longueur de Debye qui est calculée via la force ionique. De plus les valeurs trouvées doivent suivre la même tendance que celles trouvées pour les cas aux salinités inférieures sur des échantillons réalisés à partir d'un tampon à 5.10^{-2} M. Les figures 7.15 (a) et 7.15 (b) montrent la taille obtenue ainsi que le nombre de protéines agrégées par complexe en fonction de la longueur de Debye des échantillons de la partie 7.3.2 comparés aux échantillons à pH 4.7 et pH 3 vus en 6.3.

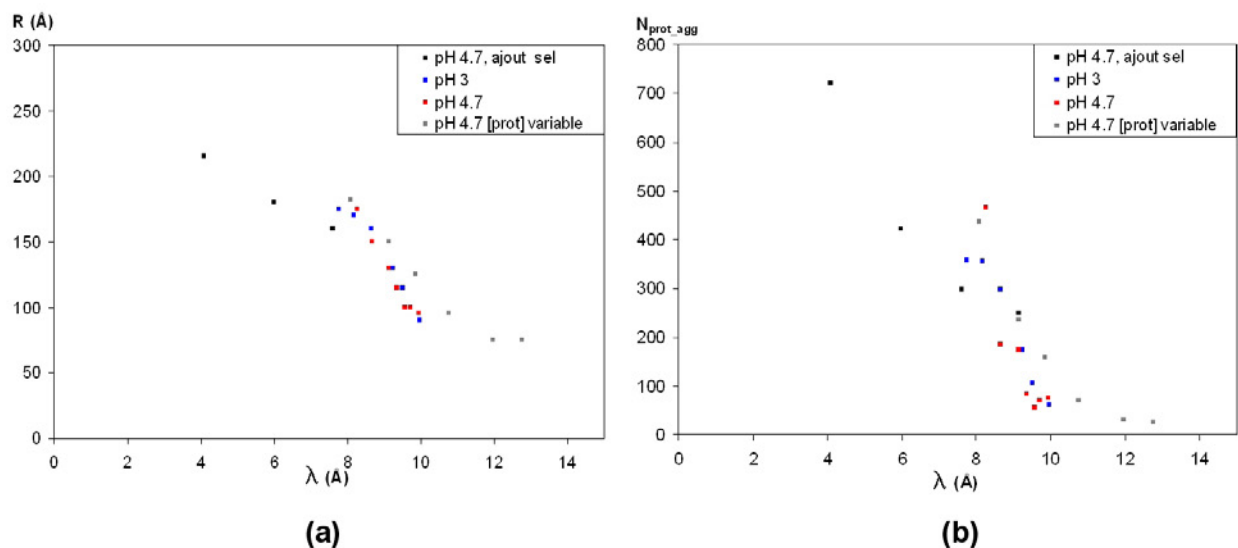


FIG. 7.15 – (a) : rayon moyen en fonction de la longueur de Debye. (b) : Nombre de protéines agrégées par complexe en fonction de la longueur de Debye.

Les courbes se complètent très bien, en effet une augmentation de la salinité aboutit à des longueurs de Debye plus petites qui n'avaient pas été atteintes jusque là. On voit parfaitement que ces longueurs de Debye mènent à des tailles de complexe plus grandes mais qui suivent la même tendance que les tailles obtenues précédemment. Cela conforte donc ce modèle, et on peut dire qu'à une longueur de Debye donnée, une taille finie et unique est atteinte. Cette longueur provient à la fois de la salinité et des charges portées par les objets en solution. Ainsi une même taille peut être atteinte en faisant varier en même temps plusieurs paramètres. La seule limite est d'avoir un rapport de charge qui n'aboutit pas à une dénaturation et une concentration en polyélectrolyte qui maintient les chaînes en dessous de c^* afin que le complexe n'adopte pas la structure gel.

Les figures 7.16 (a) et (b) reprennent le calcul de potentiel présenté dans la partie 6.5. Il est calculé pour une concentration en protéine de 40 g/L et une concentration en polyélectrolyte de 0.1 M. La taille du globule est fixée à 150 Å et la force ionique du tampon est variée entre $5 \cdot 10^{-2}$ et $5 \cdot 10^{-1}$ M.

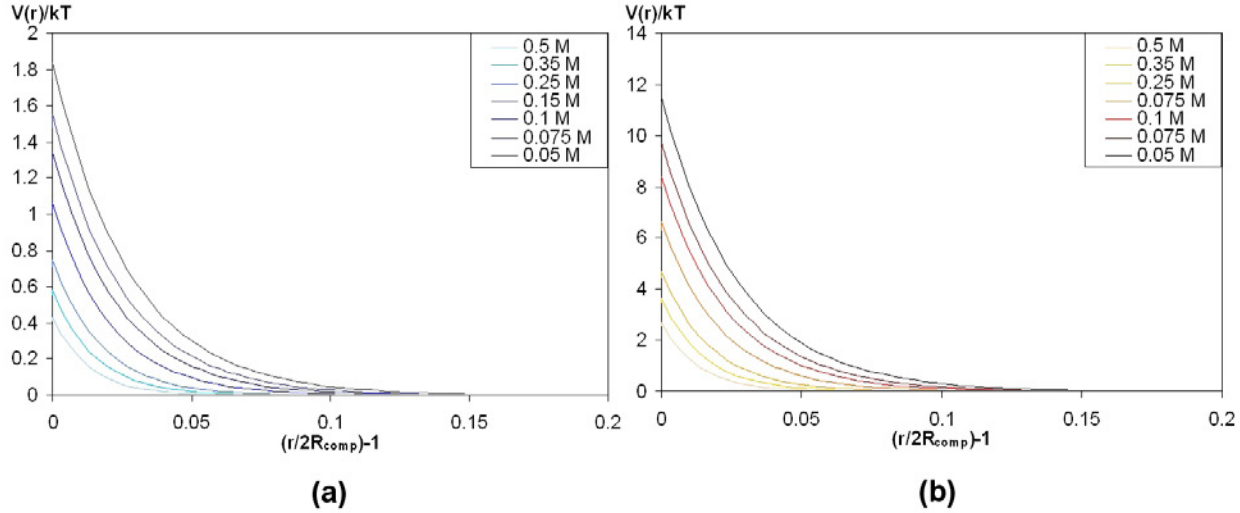


FIG. 7.16 – Potentiels en fonction de la distance des objets pour différentes salinités comprises entre $5 \cdot 10^{-2}$ et $5 \cdot 10^{-1}$ M. (a) : fraction de charges à la surface de 20 %. (b) : fraction de charges à la surface de 50 %.

Comme dans le cas de la partie 6.5, la seule inconnue est la fraction de charges de protéines à la surface. C'est pourquoi nous avons représenté en (a) une fraction de 20 % et en (b) une fraction de 50 %. Ces courbes montrent qu'une force ionique plus forte permet d'atteindre des tailles très grandes puisque pour une fraction de 20 % le potentiel est inférieur à kT dès que la force ionique est supérieure à $2.5 \cdot 10^{-1}$ M, permettant donc d'atteindre des tailles bien supérieures à 150 Å. De plus comme dans les cas précédents, une fraction de charge exposée de 50 % fait atteindre des valeurs de potentiels de plusieurs kT (de 3 à 12) alors que nous venons de voir que des tailles bien plus importantes que 150 Å sont atteintes. C'est donc bien la fraction de 20 % qui paraît la plus plausible et les valeurs de potentiel obtenues sont très cohérentes avec les résultats observés.

7.4 Résumé

Cette étude sur la variation des propriétés électrostatiques du solvant par la force ionique nous permet de mieux comprendre encore les propriétés de notre système sur plusieurs points.

Tout d'abord, nous avons vu au chapitre 4 que pour aboutir à une structure globulaire, il est nécessaire que les chaînes passent d'un régime semi-dilué à un régime dilué via une variation de c^* . Nous avons vu que lorsque les chaînes utilisées sont courtes ($N < 100$), alors l'interaction avec la protéine suffit à suffisamment abaisser la longueur de persistance du PSS pour atteindre ce régime. Les résultats de ce chapitre montrent qu'une augmentation de la force ionique du solvant a le même effet. Il peut être très marqué puisque la force ionique du solvant peut fortement moduler la longueur de persistance, ce qui permet à des chaînes de $N = 800$ de former une structure globulaire. Nous avons également vu qu'un ajout de sel à un échantillon gel le fait transiter vers la structure globulaire. Une mesure du facteur de forme des chaînes au coeur de ces globules denses a montré qu'elles adoptent une conformation gaussienne.

Un deuxième effet plus inattendu est qu'une baisse de la force ionique induit une dénaturation de la protéine. Ce phénomène peut être expliqué par le fait qu'un abaissement de la force ionique induit des interactions électrostatiques plus fortes entre le polyélectrolyte et la protéine. Ainsi il peut mieux faire interagir ses zone hydrophobes avec la protéine et la dénaturer (une proposition de mécanisme de dénaturation sera donnée au chapitre 8).

Enfin nous avons eu la confirmation que la force ionique totale du solvant (en tenant compte de celle apportée par le polyélectrolyte et la protéine) détermine la taille finie des globules. Ainsi pour un jeu de concentration en objets et de force ionique initiale du solvant aboutissant à une même force ionique finale, une même taille sera obtenue.

Chapitre 8

L'effet de dénaturation

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4, un effet totalement inédit dans l'association entre le PSSNa et le lysozyme en solution est la dénaturation de la protéine lorsqu'un rapport de charge critique est atteint (entre $[-]/[+]_{intro} = 4$ et $[-]/[+]_{intro} = 10$ suivant la taille des chaînes). Cet effet n'a jamais été observé sur un système polyélectrolyte-protéine autre que le système PSS-lysozyme à température ambiante. Cette dénaturation a en effet été observée par Ivinova et al.⁷⁰ qui étudiaient l'influence de différents polyanions sur la stabilité thermique du lysozyme. Seul le PSS permet d'obtenir la dénaturation. Dans cette étude, les auteurs utilisent des chaînes de $N = 20$ et 400 et des rapports de charge introduits supérieurs à 35, très au dessus des seuils de nos diagrammes de phase (voir figure 4.6). Par ailleurs, il a été montré que la structure secondaire du lysozyme peut être altérée par le PSS dans des multicouches PAH-PSS⁹⁴.

Ce chapitre va donc s'attacher à déterminer les cas où le lysozyme est dénaturé par le polyélectrolyte et dans quelles conditions. Nous essaierons également de déterminer l'origine de ce phénomène et nous discuterons des structures obtenues.

8.1 Dénaturation par le PSS

Une première question qui s'est posée a été de comprendre quelle spécificité du système fait que la protéine est dénaturée par le polyélectrolyte. En effet beaucoup d'études ont déjà été menées sur des systèmes lysozyme-polysaccharide du fait de son application dans les études agro-alimentaires et biologiques. Or jamais le phénomène de dénaturation n'a été reporté alors que le seul cas où une altération a été observée est en présence de PSSNa.

[70] Ivinova, O.; Izumrudov, V.; Muronetz, V.; Galaev, I.; Mattiasson, B. *Macromolecular bioscience* **2003**, 3-4, 210-215.

[94] Schwinte, P.; Ball, V.; Szalontai, B.; Haikel, Y.; Voegel, J.; Schaaf, B. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1135-1143.

Dans cette première partie nous avons cherché à connaître plus précisément les conditions de dénaturation et à en trouver l'origine.

8.1.1 Vérification par spectroscopie infra rouge

La preuve de la dénaturation en plus du changement dans le facteur de forme que nous avons vu dans les courbes de diffusion DNPA a été apportée via une mesure en spectroscopie Infra-Rouge par Transformée de Fourier. Cette technique permet de sonder les changements des structures secondaires des protéines car elles absorbent dans l'infra-rouge à des longueurs d'onde caractéristiques. Le lysozyme dans D₂O présente une bande d'absorption de la liaison amide N-H constituée de neuf pics entre 1600 et 1700 cm⁻¹. Un de ces pics provient d'une conformation en hélice α (1654 cm⁻¹) et passe à 1645 cm⁻¹ pour une conformation aléatoire⁹⁵. Le pic à 1654 cm⁻¹ est donc décalé vers les faibles longueurs d'onde lorsque le lysozyme est dénaturé. Cette méthode a été récemment utilisée sur des systèmes tensioactifs-lysozyme pour tester la dénaturation du lysozyme par des excès de SDS ou de CTAB^{95,96}.

L'expérience a été réalisée sur un spectromètre Vector 22 (Brucker) au SBFM (CEA Saclay) avec Bruno Robert. Les mesures ont été réalisées dans une cellule diamant pour éviter toute dénaturation par la surface de la cellule. Chaque spectre est enregistré avec une résolution de 2 cm⁻¹ et moyenné sur 1000 scans. La soustraction du tampon est directement réalisée sur les spectres bruts, sans soustraction de la ligne de fond. La mesure a été réalisée sur un échantillon avec des chaînes de taille $N = 630$ et un rapport de charge introduit de 10 ($[lysozyme] = 40$ g/L et $[PSS] = 0.3$ M) permettant d'avoir des concentrations élevées en constituants du mélange tout en étant loin de la transition turbide/limpide ($[-]/[+]_{intro} = 5$ pour cette longueur de chaîne). La force ionique est de 50 mM et le pH 4.7. Tous les échantillons sont réalisés dans l'eau lourde. La figure 8.1 montre les spectres d'absorption IR entre 1600 et 1700 cm⁻¹ pour le lysozyme natif, le PSSNa seul ainsi que le mélange à rapport de charge introduit 10 aboutissant à la dénaturation de la protéine. Cette mesure a été effectuée après quelques jours de repos pour atteindre un quasi-équilibre.

Le signal d'absorption du PSSNa est quasi nul dans cette gamme de longueur d'onde sondée, ainsi nous pouvons déjà dire que son signal n'interfère pas avec celui de la protéine lors de la mesure de complexes. Nous pouvons donc directement comparer les spectres d'absorption afin de voir les différences. Il apparaît que le pic d'absorption est décalé en présence de PSS. En effet le pic d'absorption pour la protéine native se situe à 1654 cm⁻¹ et il est à 1645 cm⁻¹ pour le mélange. Comme nous venons de voir que le PSSNa ne peut pas être à

[95] Huizhou, L.; Weijing, Y.; Jiayong, C. *Biochemical Engineering Journal* **1998**, 2, 187-196.

[96] Lad, M. D.; Ledger, V. M.; Briggs, B.; Green, R. J.; Frazier, R. A. *Langmuir* **2003**, 19, 5098-5103.

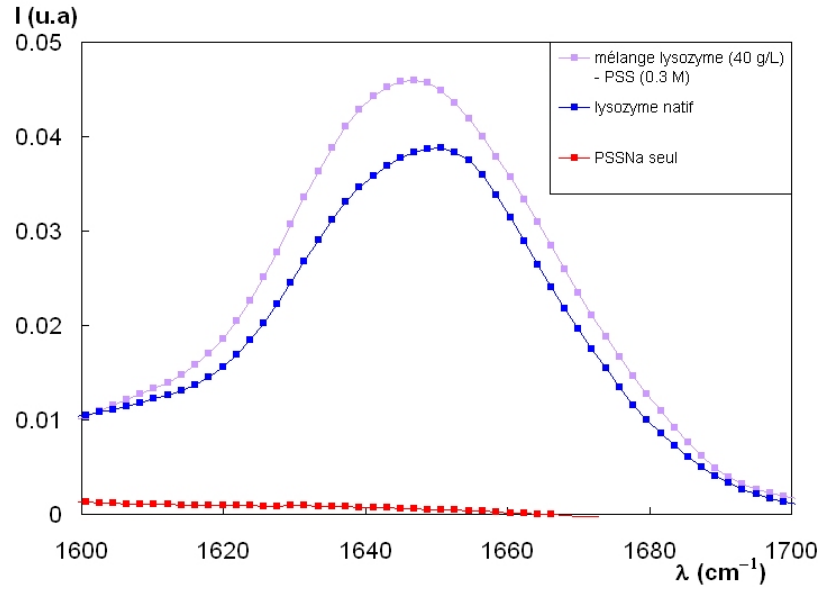


FIG. 8.1 – Spectres infra rouge du lysozyme natif, du PSS seul et du mélange en régime dénaturé

l'origine de ce déplacement, c'est bien la perte de structure secondaire qui l'a engendré. Le lysozyme est donc dénaturé.

8.1.2 Une dénaturation universelle

Afin de confirmer que la dénaturation est bien due au polyélectrolyte, et afin également de voir si cet effet est observé sur d'autres protéines, nous avons testé l'effet de dénaturation sur la napine. Cette protéine possède des caractéristiques proches du lysozyme en terme de poids moléculaire (13500) ainsi que de charge, son pH isoélectrique se situant à 11 également. La grande différence avec le lysozyme se situe au niveau de la structure puisque la napine possède une structure secondaire moins importante et des zones hydrophobes donc plus exposées. Cette protéine nous a été fournie par Isabelle Schmidt et Monique Axelos de l'INRA de Nantes et a été purifiée par leurs soins.

La figure 8.2 montre les courbes de diffusion obtenues pour un mélange PSSNa-napine dans les conditions de dénaturation ($[-]/[+]_{intro} = 20$) pour la protéine et le polyélectrolyte.

La figure 8.2 (a) représente également le facteur de forme de la napine pure en solution. On voit que celui-ci est très proche de celui du lysozyme avec une décroissance en q^{-4} à grands q puis un plateau à plus petits q . Une comparaison avec le signal de la protéine dans les complexes montre que comme dans le cas du lysozyme, celle-ci a perdu sa forme puisque le signal de diffusion passe de q^{-4} à $q^{-1.7}$. Le signal du polyélectrolyte montre pour sa part que le réseau transitoire est bien présent. La structure d'un réseau mixte de chaînes observé

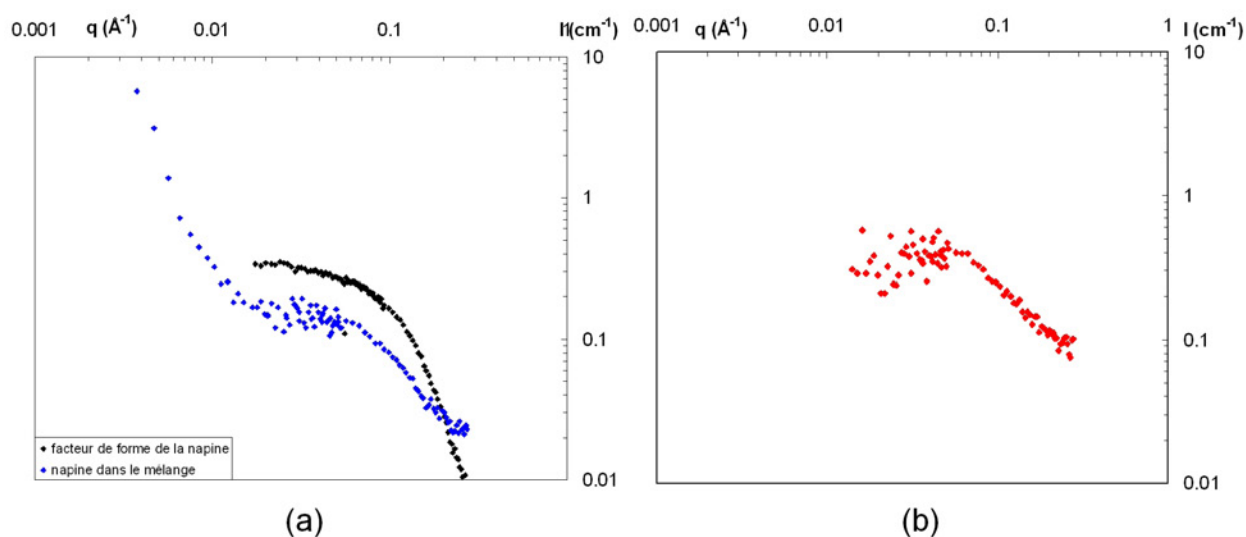


FIG. 8.2 – Courbes DNPA pour $[-]/[+]_{intro} = 20$ d'un mélange PSSNa napine. (a) : courbe de diffusion de la protéine. (b) : courbe de diffusion du polyélectrolyte.

pour le lysozyme est donc bien retrouvé pour la napine.

Cette observation permet donc de conforter le fait que la dénaturation est due à un effet spécifique des chaînes de PSS. Il est cependant également possible de penser que cette dénaturation est due à une plus grande fragilité de la protéine. Celle-ci possédant une structure secondaire moins importante et notamment moins de ponts disulfures, il paraît plus simple de la dénaturer. C'est effectivement le cas puisque la solution après avoir été préparée s'est trouvée être limpide au bout d'un quart d'heure seulement alors que quelques heures à quelques jours sont nécessaires avec le lysozyme. Cependant la napine a déjà été étudiée avec d'autres polyélectrolytes et notamment des polysaccharides⁹⁷ et aucune dénaturation n'a jamais été observée, donc cette dénaturation est bien imputable au PSS.

8.1.3 Recherche d'une origine chimique

La question à se poser ensuite est l'origine de cette dénaturation. En effet même si nous venons de voir que le PSS en est la cause, la nature même de cette dénaturation reste quelque peu floue. Nous avons donc voulu voir si cette origine était purement chimique, soit une réaction entre la protéine et la fonction sulfonate des chaînes de PSS. Afin de nous affranchir d'un effet de chaîne, nous avons utilisé du toluènesulfonate de sodium qui peut être considéré comme un monomère de PSS. Nous avons donc préparé une série d'échantillons

[97] Schmidt, I. *Thèse de doctorat Université Nantes* **2004**, .

à différents rapports de charge introduits à un pH de 4.7 ($[lysozyme] = 40$ g/L) afin de déterminer les structures obtenues. La figure 8.3 montre les différents signaux de protéine en fonction de ces rapports de charge.

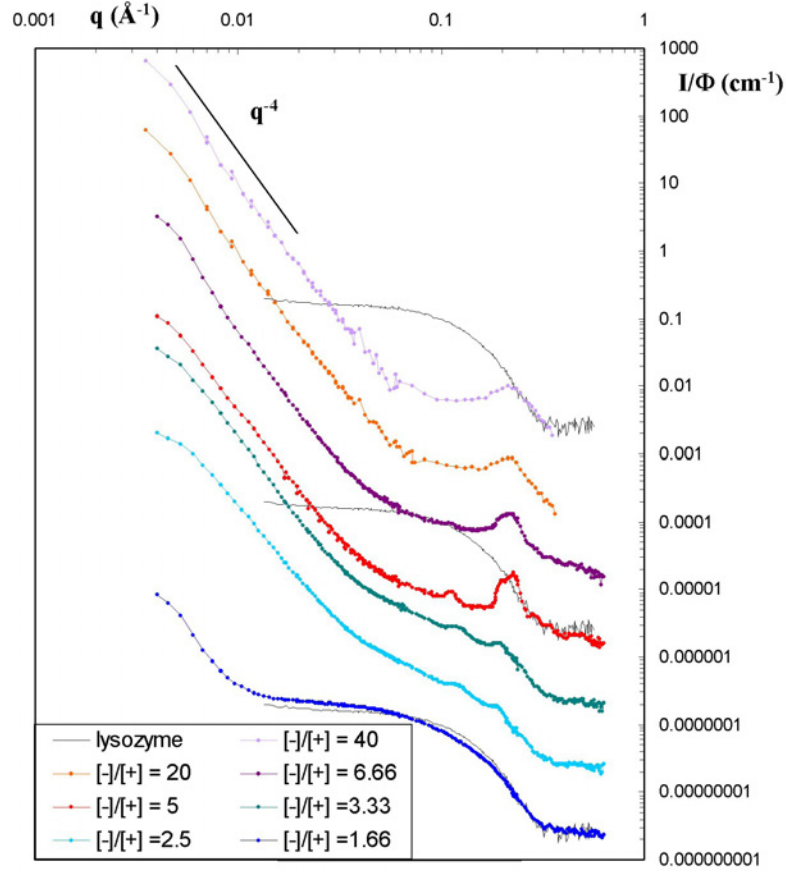


FIG. 8.3 – Courbes DNPA en fonction du rapport de charge introduit pour un mélange lysozyme - toluènesulfonate avec $[-]/[+]_{intro}$ variant entre 1.66 et 40.

Les structures obtenues sont assez différentes de celles obtenues avec des chaînes de PSS. On peut en effet voir que pour $[-]/[+]_{intro} = 1.66$, le signal de protéine suit parfaitement le facteur de forme de la protéine seule et que seule une légère diffusion à petits q est visible. Un faible apport de toluènesulfonate n'aboutit donc à aucune structure particulière.

Par contre dès $[-]/[+]_{intro} = 2.5$, on voit apparaître différents pics entre $q = 0.08$ et $q = 0.4$ Å⁻¹. Ces pics paraissent être des pics de diffraction résultants d'une cristallisation de la protéine et suivis à plus petits q d'une forte diffusion en q^{-4} . Enfin dès $[-]/[+]_{intro} = 6.66$ ces pics s'estompent pour laisser apparaître un pic de corrélation à 0.2 Å⁻¹ suivi d'une diffusion en q^{-4} jusqu'au bout de la gamme de q sondée.

Le rapport de charge le plus élevé sondé ici est $[-]/[+]_{intro} = 40$ soit largement au delà de la limite de dénaturation observée même pour les chaînes les plus courtes. On atteint

d'ailleurs à ce rapport la limite de solubilité du toluènesulfonate. Or même à ce rapport de charge introduit très élevé, le lysozyme n'est pas dénaturé et la structure formée semble être un amas de protéines sans organisation particulière, comme l'atteste le pic de corrélation et la pente à petits q . Ainsi la dénaturation est donc un phénomène qui n'apparaît qu'avec les chaînes de PSS et pas avec le monomère équivalent. Il y a donc indéniablement un "effet polymère" qui induit la dénaturation de la protéine et non uniquement une réaction entre la fonction sulfonate des chaînes de PSS et la protéine.

L'explication à ce phénomène peut provenir du fait que les chaînes en interagissant avec la protéine la bloque dans une certaine conformation, ne lui permettant pas de se placer comme elle le souhaite face aux noyaux benzéniques du squelette du polyélectrolyte, eux-mêmes obligés de rester proches les uns des autres du fait qu'ils sont reliés par la chaîne aliphatique. C'est ensuite l'interaction de ces noyaux hydrophobes avec la protéine qui pourraient expliquer son dépliement. Dans le cas du toluènesulfonate, celui-ci étant libre, les parties hydrophobes peuvent se placer hors de contact de la protéine et donc la dénaturation ne peut avoir lieu.

Si cette expérience vient de montrer que seul le motif du PSS ne suffit pas à dénaturer la protéine, il a par contre la capacité de la faire cristalliser comme l'atteste la présence de pics de diffraction dans le signal de diffusion. Nous avons donc essayé via ces données de déterminer la structure dans laquelle le lysozyme a cristallisé dans nos échantillons. La figure 8.4 montre une représentation en abscisse linéaire du signal qui permet de mieux discerner les différents pics.

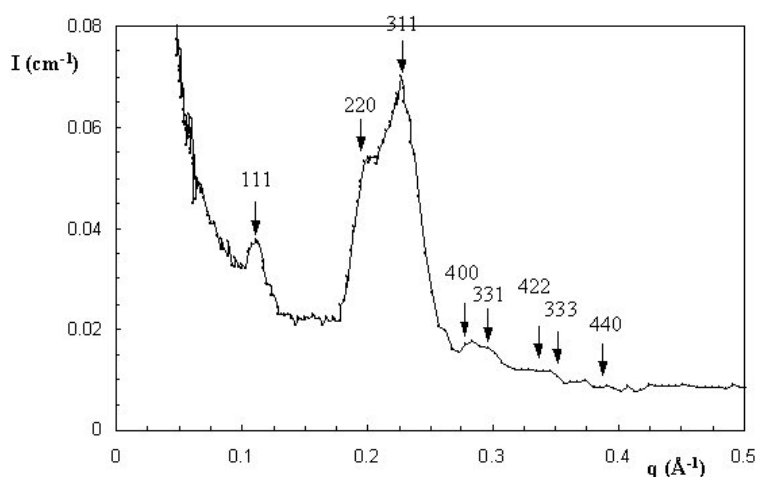


FIG. 8.4 – Indexation des pics de diffraction de la courbe pour $[-]/[+]_{intro} = 5$ pour une structure diamant.

Nous avons essayé plusieurs structures afin de trouver celle qui correspond le mieux aux pics observés, mais les pics de diffraction étant mélangés au signal de diffusion (facteur de forme et pic de corrélation) cette analyse est très limitée. Nous avons cependant réussi à trouver une configuration qui permet d'indexer les pics présents. Cette structure est la structure diamant soit une structure cubique avec une protéine en (0,0,0) et une autre en (1/4,1/4,1/4) avec un paramètre de maille de 93 Å. Cette structure ne fait pas partie des structures typiques observées pour un cristal de lysozyme qui forme plutôt des structures tétragonales, orthorhombiques, hexagonales, monocliniques ou tricliniques⁹³. En particulier, la structure ne peut pas correspondre à une structure tétragonale de paramètre de maille ($a = b = 80$ Å, $c = 37$ Å) qui est la structure la plus communément observée à pH 4.7 en présence de différents sels. Mais la présence de toluènesulfonate qui est un sel organique très gros comparé aux sels minéraux utilisés habituellement peut expliquer ce phénomène. Il a en effet déjà été montré que le sel peut être inclus dans la structure formée⁹⁸, cela pourra donc expliquer l'obtention de cette structure. La faible résolution sur les pics ne permet cependant pas d'affirmer avec certitude que la structure adoptée est de type diamant.

8.2 Structures obtenues à l'équilibre

Après avoir vu que le PSS est la cause de la dénaturation, nous avons cherché à voir si plusieurs structures sont accessibles à l'équilibre. En effet jusqu'ici la structure formée est un réseau mixte de chaînes en solution qui est indépendant des paramètres tels que le rapport de charge ou la taille des chaînes utilisées.

8.2.1 Structures pour un fort excès de PSS

Tout d'abord rappelons exactement les caractéristiques des courbes obtenues pour les cas où la protéine est dénaturée avec un fort excès de PSS ($[-]/[+]_{intro} = 20$). La figure 8.5 a déjà été présentée dans le chapitre 4 et est ici remontrée pour mémoire.

Cette figure permet de voir que la taille des chaîne utilisée n'influe pas sur la structure finale obtenue puisque toutes les courbes pour chacun des contraste sont similaires. Seul le signal de la protéine dans le cas d'échantillons avec des chaînes très courtes ($N = 40$) voit son plateau être à une intensité légèrement plus importante que les autres. Nous expliquerons ce phénomène dans la partie 8.2.2.

Les signaux possèdent des caractéristiques précises :

[93] Ries-Kautt, M. ; Ducruix, A. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 745-748.

[98] Vekilov, P. G. ; Monaco, L. A. ; Thomas, B. R. ; Stojanoff, V. ; Rosenberger, F. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1996**, 52, 785-798 Part 4.

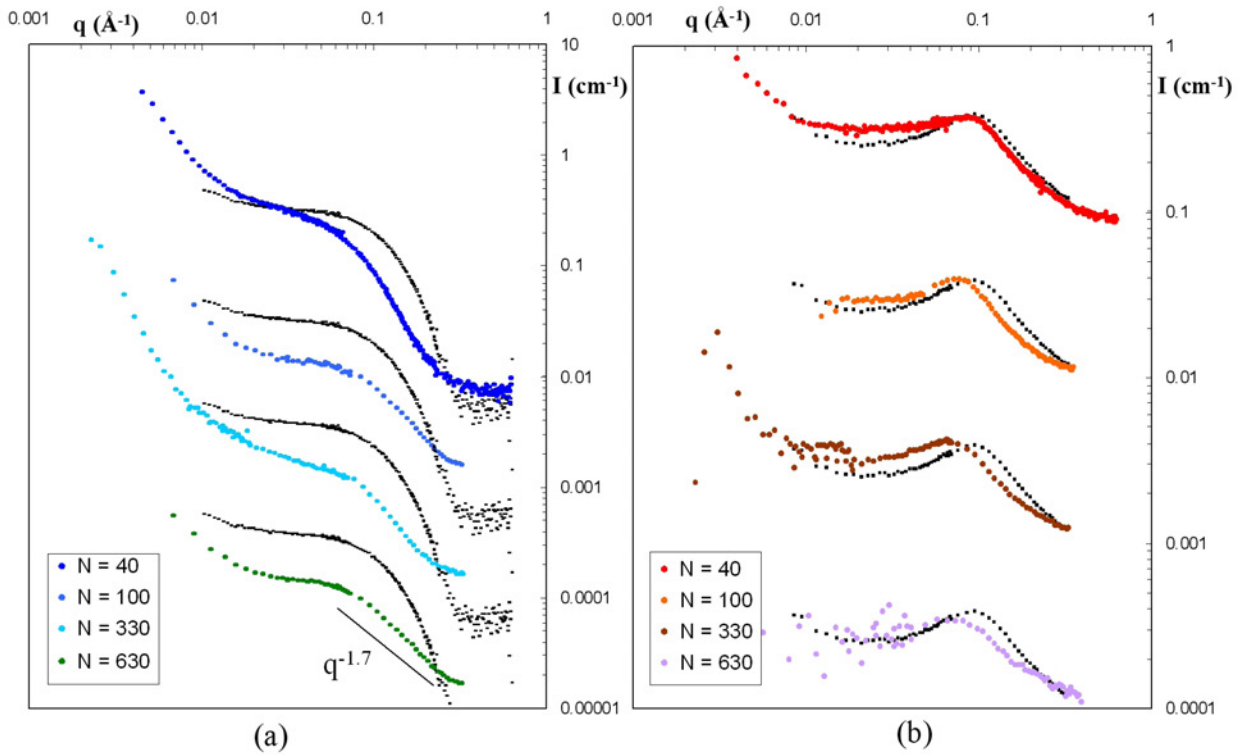


FIG. 8.5 – Courbes DNPA en fonction de la taille des chaînes PSSNa pour un rapport de charge introduit de 20. (a) : courbes de diffusion de la protéine décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte décalées d'un facteur 10.

Pour le signal de protéine, cette dénaturation se caractérise principalement par un changement de diffusion à grands q , la protéine voyant sa diffusion passer de q^{-4} à $q^{-1.7}$, soit d'un signal de sphère à celui d'une chaîne à volume exclus. La figure 8.6 (a) représente le signal de protéine en $Iq^{1.7}(q)$ ce qui permet de mieux voir cette diffusion. La figure 8.6 (b) représente quant à elle le spectre de diffusion du polyélectrolyte en échelle linéaire, ce qui permet de mieux observer le pic de corrélation.

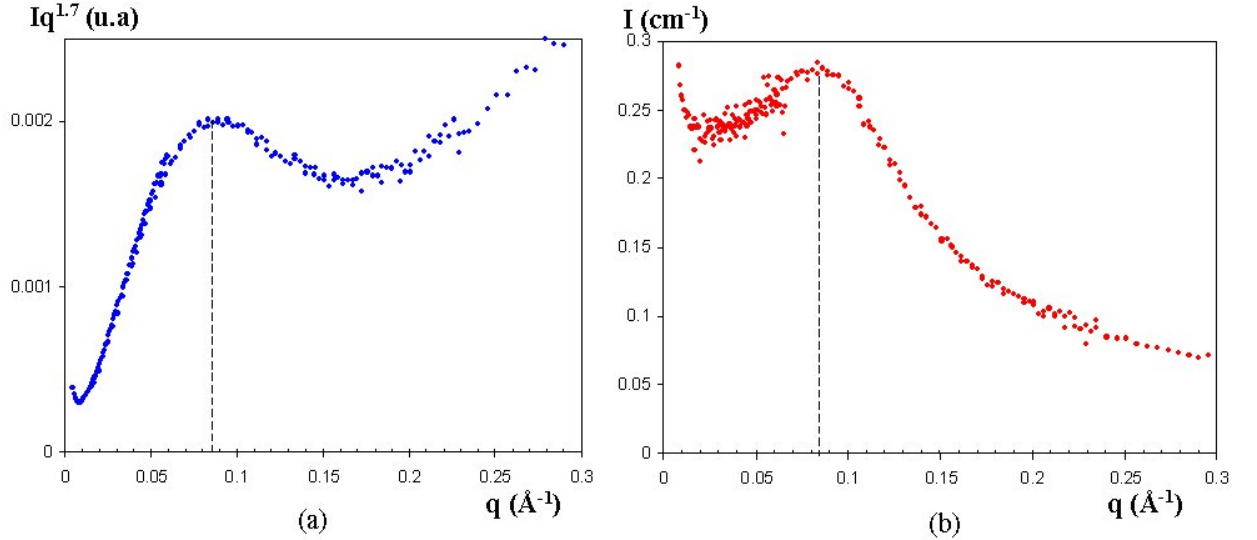


FIG. 8.6 – Courbes DNPA pour $N = 40$ et $[-]/[+]_{intro} = 20$. (a) : représentation en $Iq^{1.7}$ du signal de protéine. (b) : représentation en axes linéaires du signal de polyélectrolyte

Ces deux représentations permettent de bien caractériser la structure formée. En effet on observe que le pic de corrélation du polyélectrolyte qui définit donc la maille de son réseau se trouve exactement à la même abscisse (0.085 \AA^{-1}) que le pic de la représentation $Iq^{1.7}(q)$ du signal de protéine. Cela démontre que les deux composés partagent une co-structure en solution avec une distance caractéristique similaire. On notera que les chaînes ne se décorrent pas les unes les autres puisque les signaux à grands q ne sont pas similaires, on peut donc dire que si les chaînes partagent une co-structure, celle-ci est la superposition de deux organisations distinctes entre la protéine et le polyélectrolyte. Cette structure est rappelée sur la figure 8.7.

8.2.2 Peut-il y avoir plusieurs structures pour la protéine dénaturée ?

Nous venons de voir que la structure finale du mélange polyélectrolyte-protéine dans les conditions de dénaturation est la même pour toutes les tailles de chaînes utilisées. Cependant

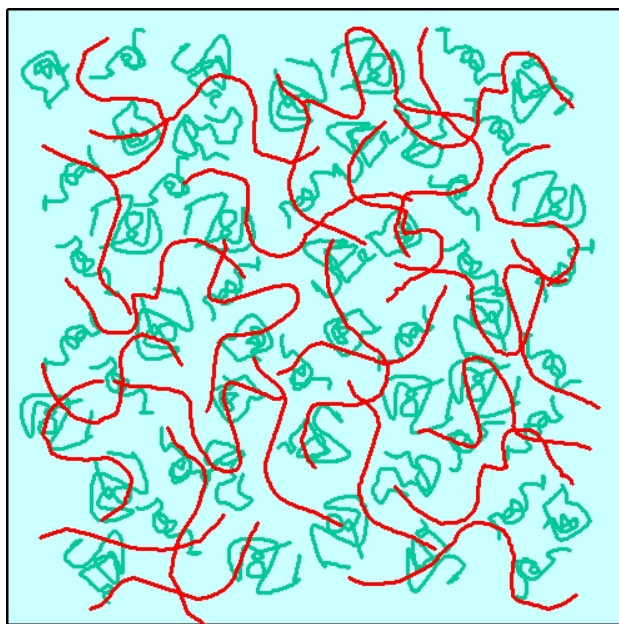


FIG. 8.7 – Représentation schématique de la structure pour un rapport de charge introduit de 20

pour la taille de chaînes la plus petite ($N = 40$) le signal de la protéine voit son plateau être à une valeur d'intensité plus importante que les autres. Nous avons donc voulu connaître la raison de cette différence. Une série d'échantillons a donc été préparée en faisant varier la taille des chaînes ainsi que la concentration en chacun des composés dans la zone limpide du diagramme de phase. Ces échantillons ont été mesurés uniquement dans le contraste éteignant le signal du polyélectrolyte par manque de temps. Ces échantillons ont été préparés et mesurés par Cyril Dauphin, stagiaire de maîtrise, au laboratoire.

La figure 8.8 reporte ces différentes courbes de diffusion en fonction des différents paramètres.

La première série de courbes (figure 8.8 (a)) est constituée d'échantillons préparés avec une concentration fixe en polyélectrolyte (0.3 M) de deux tailles différentes ($N = 100$ et $N = 600$ monomères) avec une concentration variable en protéine. Les signaux sont représentés en I/Φ pour pouvoir être directement comparés. Elle montre que lorsque la concentration en protéine est inférieure à 40 g/L tous les signaux se recouvrent. Par contre une fois cette concentration en protéine égale à 40 g/L alors l'intensité du plateau est plus importante et ce d'autant plus que la longueur des chaînes est élevée. De plus la position en q de l'épaulement est décalée vers les petits q .

Sur la deuxième série de courbes (figure 8.8 (b)), c'est cette fois la concentration en protéine qui est fixée à 20 g/L et la concentration en chaînes de PSS ainsi que leur taille qui

est variable.

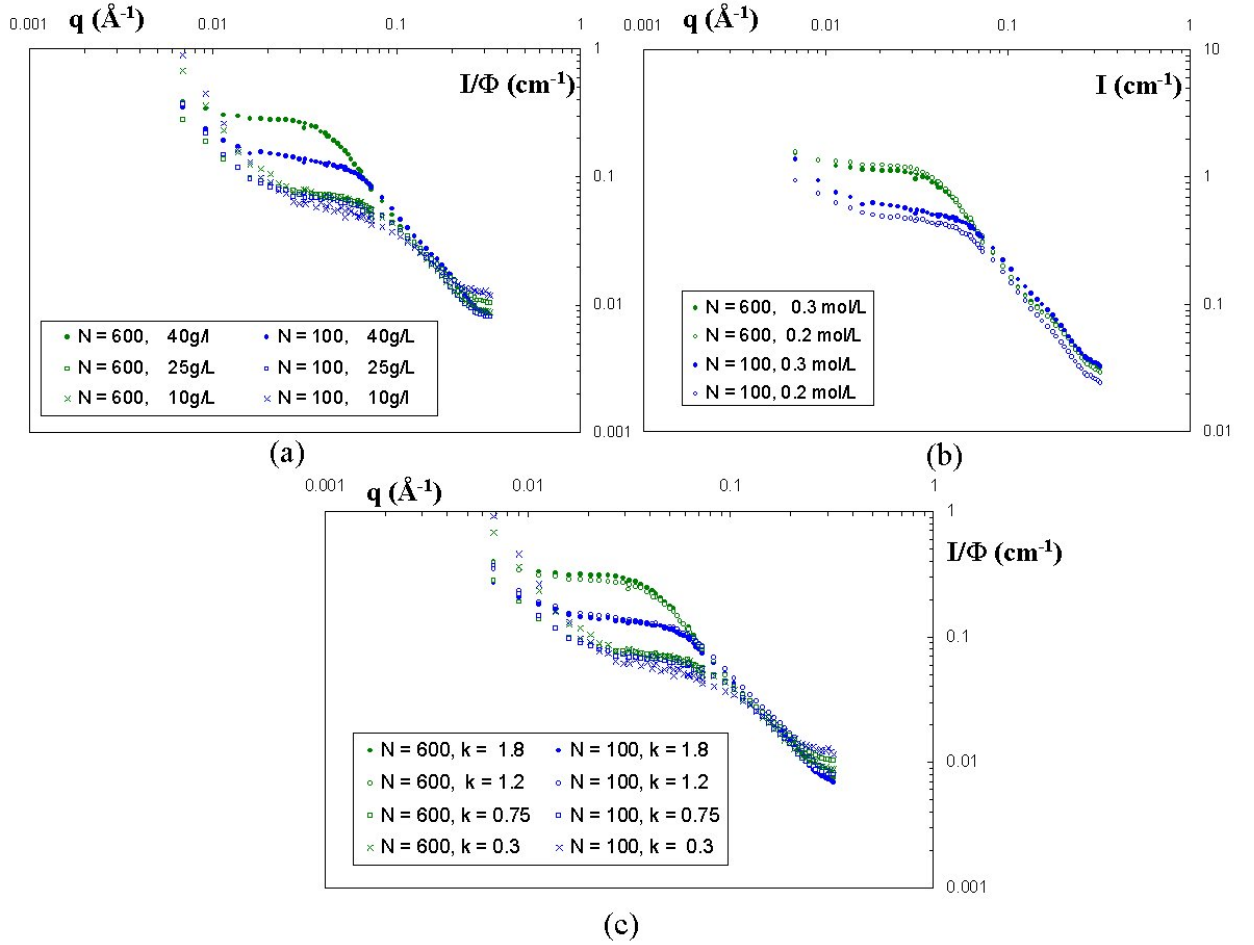


FIG. 8.8 – Courbes DNPA de lysozyme dénaturé. (a) : concentration en PSS de 0.3 M et concentration en lysozyme variable. (b) : concentration en PSS variable et concentration en lysozyme à 40 g/L. (c) : récapitulatif des courbes.

Cette figure montre également que l'intensité du plateau et la valeur en q de l'épaule sont variables. C'est dans ce cas la taille des chaînes qui fait dépendre l'intensité obtenue. En effet les deux signaux pour la taille de chaîne $N = 600$ sont situés au dessus des deux signaux de la taille de chaînes $N = 100$.

Nous avons donc, à la lecture de ces courbes de diffusion, cherché à déterminer la paramètre qui fait varier ces intensités. Le paramètre considéré et appelé ici k est le rapport entre le nombre de résidus de lysozyme (soit le nombre d'acides aminés) en solution et le nombre de monomères de PSS en solution (donc indépendant de la taille des chaînes).

$$k = \frac{\text{Nombre de résidus de protéine}}{\text{Nombre de monomères de PSS}} \quad (8.1)$$

La figure 8.8 (c) retrace les courbes montrées en (a) et en (b) mais toutes en I/Φ . Cette fois la légende tient compte de ce rapport k calculé pour chacune des concentrations en PSS. On voit que le signal final obtenu est le même quelle que soit la taille tant que $k < 1$. Par contre dès que $k > 1$, alors le plateau du signal de la protéine est à une intensité plus importante et l'épaule est déplacé vers les plus petits q , et ce d'autant plus que la taille des chaînes de PSS est grande. Pour une taille donnée, cette valeur de plateau et d'épaule est constante une fois $k > 1$.

Ceci signifie donc que tant que le nombre de monomères de PSS en solution est supérieur au nombre de résidus de protéine, ce sont les chaînes de PSS qui imposent la taille du réseau mixte formé. Par contre si le nombre de résidus de protéines est plus important que le nombre de monomères ($k > 1$) alors l'épaule est déplacé vers les petits q indiquant que le réseau possède alors une taille de maille plus grande. De plus ce déplacement est d'autant plus important que les chaînes sont longues. Dans ce cas, la structure ne correspond plus à la structure présentée sur la figure 8.7 même si les deux types de chaînes doivent partager une costructure. Seule la mesure du signal des chaînes de PSS quand $k > 1$ nous permettrait de répondre à cette question.

8.3 Rôle de la compacité de la structure initiale

Nous avons voulu dans cette partie déterminer l'influence de la compacité sur les capacités de dénaturation du PSSNa. En effet nous avons vu que cette dénaturation n'est pas immédiate et que donc doivent intervenir des mécanismes qui demandent une interaction particulière entre la protéine et le polyélectrolyte, processus nécessitant que les deux objets soient en contact. Ainsi l'étude de la dénaturation en fonction de la compacité va nous éclairer sur ce point.

8.3.1 Effet de taille de chaînes de PSS

Un paramètre important influant sur la compacité des complexes est la taille des chaînes. Nous avons en effet vu tout au long de l'étude que lorsque les complexes sont formés avec des chaînes longues, ceux-ci sont beaucoup moins denses. A terme, ceux-ci sont si peu denses qu'ils ne forment plus de complexes mais des gels réticulés (cf chapitre 3). De même si nous avons montré qu'une salinité suffisante ou une concentration inférieure peut permettre d'aboutir à des complexes primaires, nous avons également montré grâce à l'expérience de conformation des chaînes de PSS à l'intérieur des globules que ceux-ci sont beaucoup moins denses que ceux formés avec les chaînes courtes. Nous avons donc comparé cette compacité

à la capacité de dénaturation. Pour cela nous rappelons ici une figure présentée dans le chapitre 3 et montrant le rapport de charge introduit nécessaire (donc la concentration en polyélectrolyte) pour dénaturer la protéine.

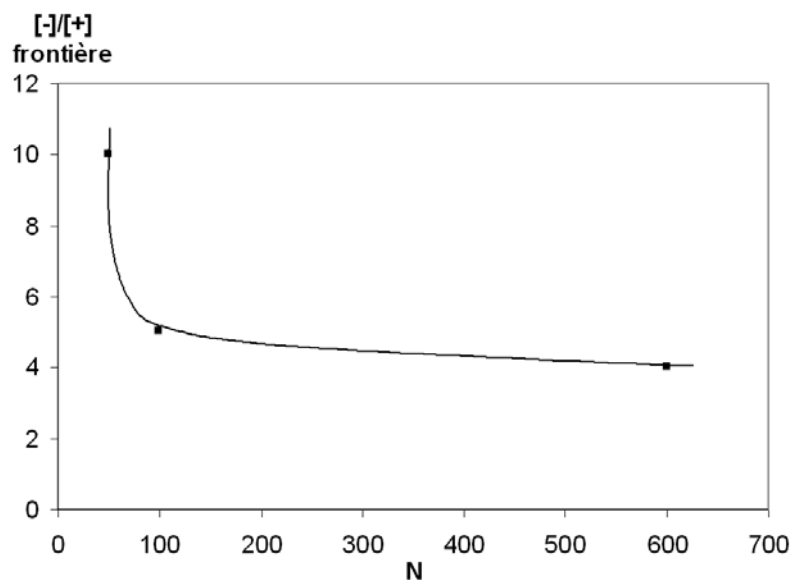


FIG. 8.9 – Frontière entre zone turbide et zone limpide en fonction de la taille des chaînes

La figure 8.9 montre clairement une dépendance entre la taille des chaînes et la concentration nécessaire en PSS pour dénaturer le lysozyme. La dénaturation est beaucoup plus aisée dès que des tailles de $N = 100$ sont atteintes puisque deux fois moins de chaînes de PSS sont nécessaires pour la dénaturation. Ce résultat va dans le même sens que la compacité des complexes.

On peut donc en déduire que la dénaturation a lieu d'autant plus facilement que la compacité est faible. Ayant vu que la dénaturation est un processus non immédiat, ce résultat est d'autant plus facile à interpréter. En effet si le PSS doit, avant de dénaturer la protéine, accéder à elle au sein de la structure formée initialement, cette accession sera facilitée lorsque celle-ci est lâche.

8.3.2 Dénaturation sur des globules denses préformés

Nous venons de voir que la dénaturation est d'autant plus aisée que la compacité des complexes est faible. Un moyen de valider d'autant plus ce résultat est de sonder les capacités de dénaturation sur des complexes déjà formés et donc d'autant plus denses. Les résultats de cette expérience ont déjà également été montrés en 6.4.2 afin de sonder justement la compacité des complexes. Nous avons vu à ce moment que les complexes denses une fois

formés, il est nécessaire d'apporter beaucoup plus de PSS pour observer la dénaturation. La frontière de dénaturation est décalée vers les forts rapports de charge et il reste des protéines non dénaturées même lorsque le rapport de charge atteint 20. La diffusion des espèces dans le coeur des complexes primaires est en effet très limitée par la très forte compacité du coeur. Cette expérience est résumée sur la figure 8.10

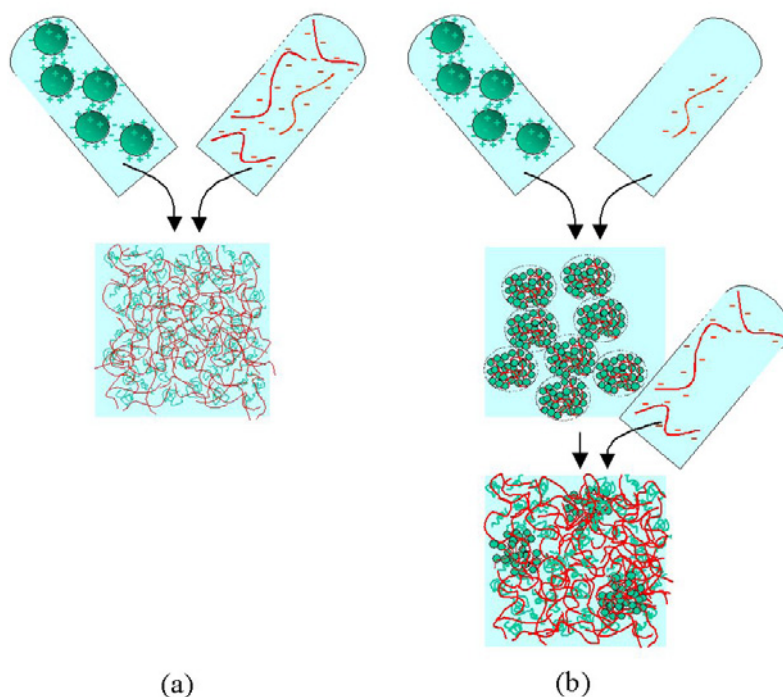


FIG. 8.10 – Représentation schématique des expériences de dénaturation. (a) : dénaturation en mélange initial. (b) : dénaturation sur des globules préformés.

8.3.3 Structure à $t = 0$ et évolution cinétique

Un dernier moyen pour évaluer l'effet de la compacité sur la dénaturation a été de faire un suivi cinétique de celle-ci. Nous avons vu que la dénaturation est un processus cinétique et nous également vu (cf chapitre 4) que le temps d'obtention des échantillons limpides est fonction de l'excès de PSS en solution. Nous avons choisi d'étudier des chaînes courtes ($N = 40$) à un rapport de charge introduit de 10 afin de ne pas avoir une cinétique trop rapide. Pour cette taille de chaînes, les protéines ne sont pas complètement dénaturées pour $[-]/[+]_{intro} = 8$ (cf figure 4.13). La concentration utilisée en protéine est 25 g/L et celle en PSS est 0.2 M. La limite de cette expérience étant le temps d'acquisition des spectres de neutrons qui est de l'ordre de quelques minutes. Contrairement aux autres expériences de DNPA pour lesquelles les mesures ont été effectuées deux jours après la réalisation des mélanges, les

échantillons ont été mesuré immédiatement après mélange pour ce suivi cinétique. Il y a eu environ une minute de temps mort entre la réalisation de l'échantillon et le début du comptage du premier spectre. La mesure ayant été effectuée sur trois configurations pour deux contrastes différents, il a fallu préparer six échantillons similaires pour cette expérience. Les raccordements parfaits entre les configurations des spectres des figures 8.11 et 8.12, qui évoluent très rapidement, montre que la préparation des échantillons est très reproductible.

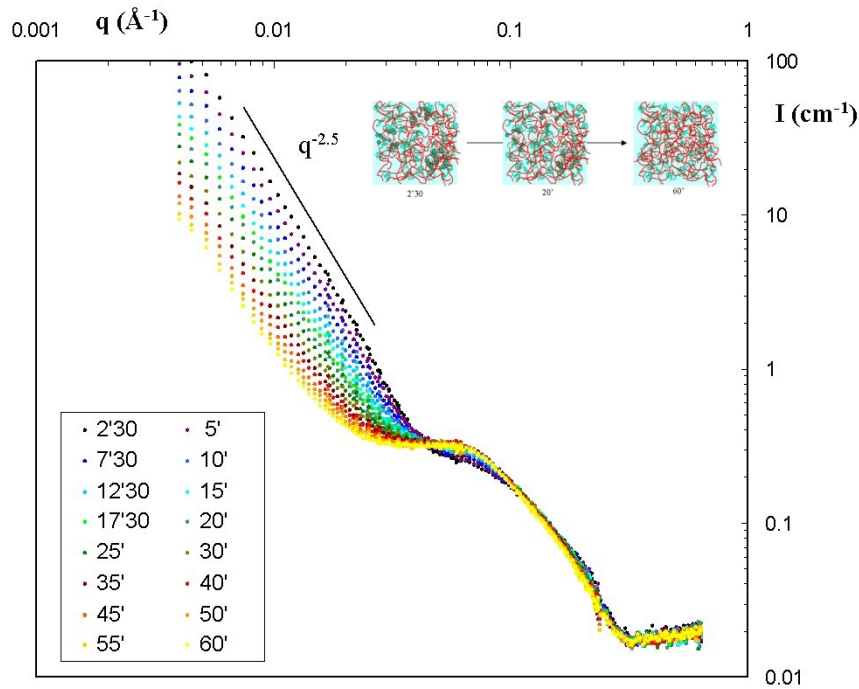


FIG. 8.11 – Courbes DNPA en fonction du temps pour $[-]/[+]_{intro} = 10$, courbes de diffusion de la protéine (en encart : schéma de l'évolution de l'échantillon).

Sur les figures 8.11 et 8.12 sont représentées les courbes de diffusion de la protéine et du polyélectrolyte en fonction du temps. L'acquisition a duré 2'30 de $t = 0$ à $t = 20$ minutes puis ensuite est passé à 5 minutes. On peut ainsi observer l'évolution du système sur une durée d'une heure à partir du moment où le mélange a été effectué.

Les caractéristiques initiales des signaux de diffusion pour la protéine et le polyélectrolyte montrent que la structure initialement formée est le gel réticulé. En effet pour la protéine on retrouve un signal de facteur de forme de protéine à grands q et une diffusion en $q^{-2.5}$ à plus petits q . Pour le polyélectrolyte, on retrouve le pic de corrélation du réseau puis également une légère diffusion à petits q due à des hétérogénéités. L'obtention de cette structure s'explique par la concentration élevée en PSS (0.2 M) qui fait que nous sommes dans le régime semi-dilué bien que les chaînes soient courtes ($N = 40$). On observe cependant le présence d'un léger pic à 0.2 \AA^{-1} dans le signal de la protéine à $t = 0$ ainsi que sur le

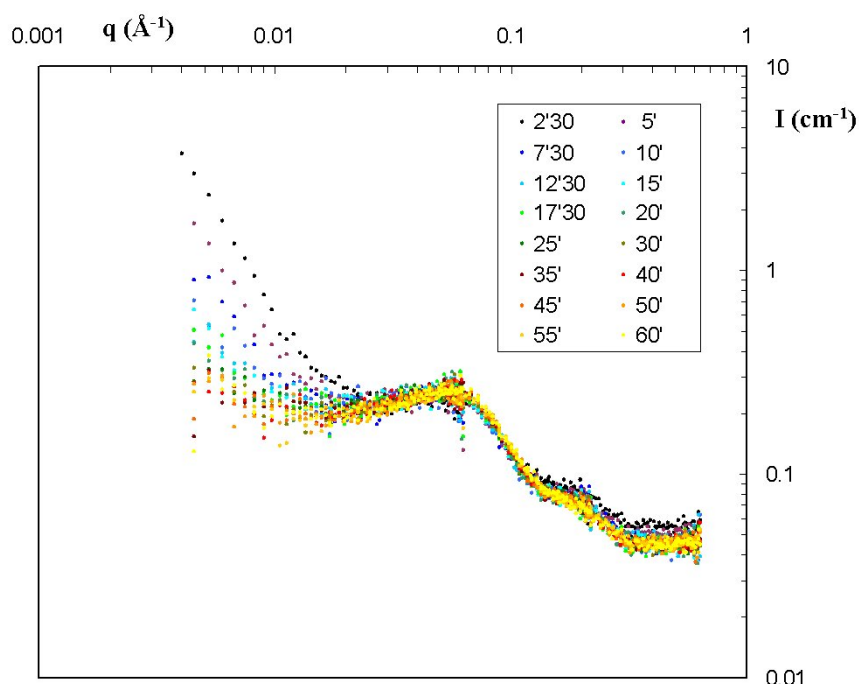


FIG. 8.12 – Courbes DNPA en fonction du temps pour $[-]/[+]_{intro} = 10$, courbes de diffusion du polyélectrolyte.

signal du polyélectrolyte. Ces pics disparaissent ensuite au cours du temps au fur et à mesure de la dénaturation de la protéine.

L'évolution la plus spectaculaire a lieu pour le signal de la protéine. On voit très bien l'intensité à petits q chuter en fonction du temps, signe que les zones hétérogènes disparaissent au progressivement. De plus le signal à grands q s'approche de plus en plus d'une diffusion en $q^{-1.7}$ caractéristique des protéines dénaturées. On voit également l'épaule se déplacer vers des plus petites valeurs de q et au final atteindre la valeur du pic polyélectrolyte (0.06 \AA^{-1}).

Au final nous pouvons dire que la structure adoptée avant la dénaturation est un réseau lâche et peu dense à peine perturbé par la présence de la protéine ce qui fait qu'elle se retrouve très accessible aux chaînes de PSS. Pour les concentrations élevées initiales en chaînes, l'abaissement du c^* après interaction avec les protéines ne permet jamais de passer en régime dilué et de former les globules denses, peu favorables à la dénaturation. La structure initiale dans les solutions pour lesquelles le lysozyme est dénaturé est donc très similaire au gel réticulé par les protéines. La seule différence est la concentration en protéines, bien supérieure dans le cas des gels, qui ne permet pas une bonne accessibilité aux chaînes. Cette structure initiale peut également expliquer "l'effet polymère" de la dénaturation car le réseau transitoire de chaînes piégeant les protéines n'existe évidemment plus avec le toluènesulfonate. Comme

nous avons vu que la dénaturation n'a lieu que pour des rapports de charge introduits élevés cela confirme le fait que cette dénaturation a lieu principalement lorsque la compacité de la structure formée est faible.

8.4 Influence de la densité de charge des objets sur dénaturation

Nous avons dans cette dernière partie voulu déterminer si la dénaturation avait lieu lorsque la densité de charge sur les objets est changée. Pour cela nous avons fait varier le pH pour varier la densité de charges sur la protéine et le taux de charge f sur le polyélectrolyte.

8.4.1 Variation de la densité de charge sans ajout hydrophobe

Nous avons tout d'abord fait varier la densité de charges sur la protéine. Pour cela nous avons fait varier le pH entre 3 et 10 sur des chaînes $N = 600$.

Une première partie des résultats a déjà été montrée dans le chapitre 3 où nous avons montré que la frontière entre le régime turbide et le régime limpide est indépendante du pH et que seul le rapport de charge introduit fixe cette frontière. Nous rappelons ici ces résultats sur la figure 8.13.

Nous avons également effectué des mesures de DNPA sur des échantillons préparés à deux rapports de concentration qui sont les rapports usuels de chacun des domaines à pH 4.7, à savoir 0.1 M de PSS et 40 g/L de lysozyme pour le régime turbide et 0.3 M de PSS et 20 g/L de lysozyme pour le régime limpide. La taille de chaîne utilisée a été $N = 100$ unités. Les courbes de diffusion neutrons de ces différents échantillons sont représentées sur la figure 8.14 pour les différents pH.

Les figures 8.14 (a) et 8.14 (b) montrent les courbes de diffusion pour la protéine et le polyélectrolyte dans le premier rapport de concentration (0.1 M de PSS et 40 g/L de lysozyme). Suivant le pH, ce rapport de concentration fait varier le rapport de charge introduit entre 2.15 et 9. Les signaux des échantillons à pH 3 et 4.7 présentent les caractéristiques des globules denses. Pour le signal de protéine : le pic de corrélation à 0.2 \AA^{-1} après une première diffusion en q^{-4} à grands q suivi d'une seconde diffusion en q^{-4} du aux complexes primaires et enfin un changement de pente à plus petits q pour l'organisation fractale des complexes primaires. Les signaux de polyélectrolyte sont semblables à ceux de la protéine sauf à grands q où la diffusion est en q^{-1} . Par contre pour les pH 7 et 10, le rapport de charge introduit passe à 4.5 et 9 respectivement ce qui aboutit à la dénaturation de la protéine. Pour le pH 7, cette dénaturation est partielle car nous nous trouvons juste à la frontière et le signal

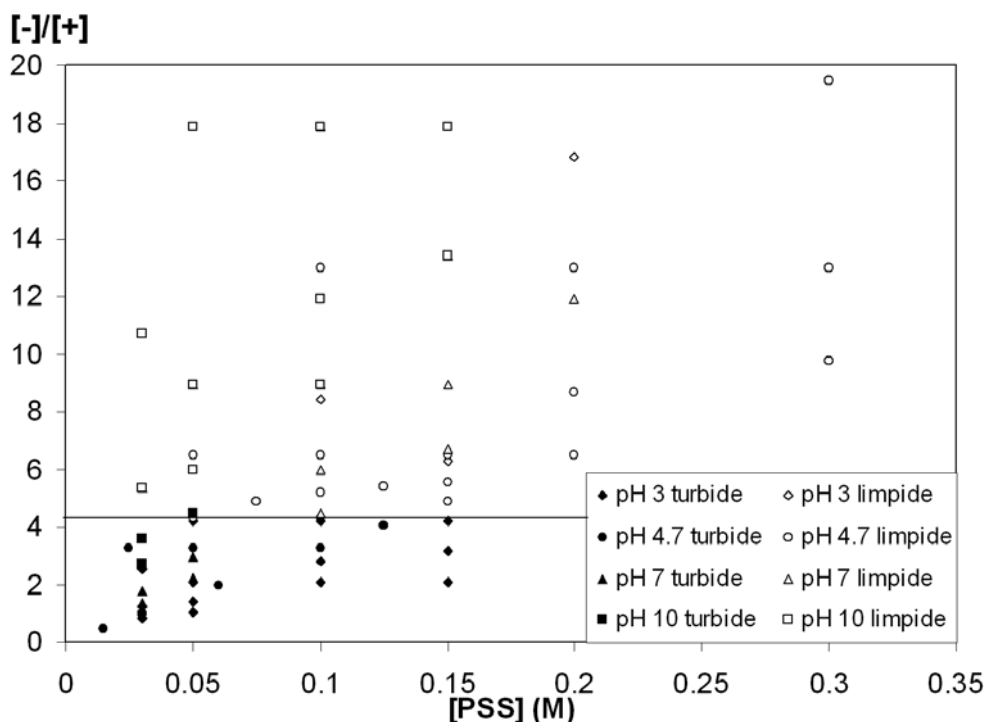


FIG. 8.13 – Diagrammes d'état pour les quatre pH en fonction du rapport de charge introduit

résultant est un mélange de signal de globule dense et de protéine dénaturée. Pour le pH 10 le signal n'est non plus pas tout à fait celui de la structure dénaturée mais cette fois c'est plutôt un effet cinétique qui doit en être à l'origine, à savoir qu'au moment de la mesure tout le lysozyme n'avait sûrement pas eu le temps d'être dénaturé. Les signaux correspondant de polyélectrolyte montrent d'ailleurs que cette dénaturation n'est pas totale puisque le réseau polyélectrolyte n'est pas totalement retrouvé, seul une légère inflexion apparaît à la position du pic polyélectrolyte.

Le cas du deuxième rapport de concentration est lui assez simple puisque tous les rapports de charge correspondants se situent au delà de la limite de dénaturation, le plus faible étant 13 pour le pH 3. Le fait d'être si loin dans le régime dénaturé permet aux différents échantillons d'être composés uniquement de protéine dénaturée comme le montre la figure 8.14 (c). Les signaux de protéine ont tous perdu la diffusion en q^{-4} à grands q ainsi que leur diffusion à petits q . Seul le signal de protéine pour le pH 3 possède encore une légère diffusion aux petits q , signe de la présence résiduelle de zones hétérogènes. Enfin sur la figure 8.14 (d) qui montre les spectres de polyélectrolyte pour ces mêmes échantillons, la présence du réseau polyélectrolyte est bien vérifiée puisque tous les spectres possèdent le pic caractéristique de cette structure.

Comme nous l'avons montré dans le chapitre 4, le pH n'influe donc pas sur les capacités

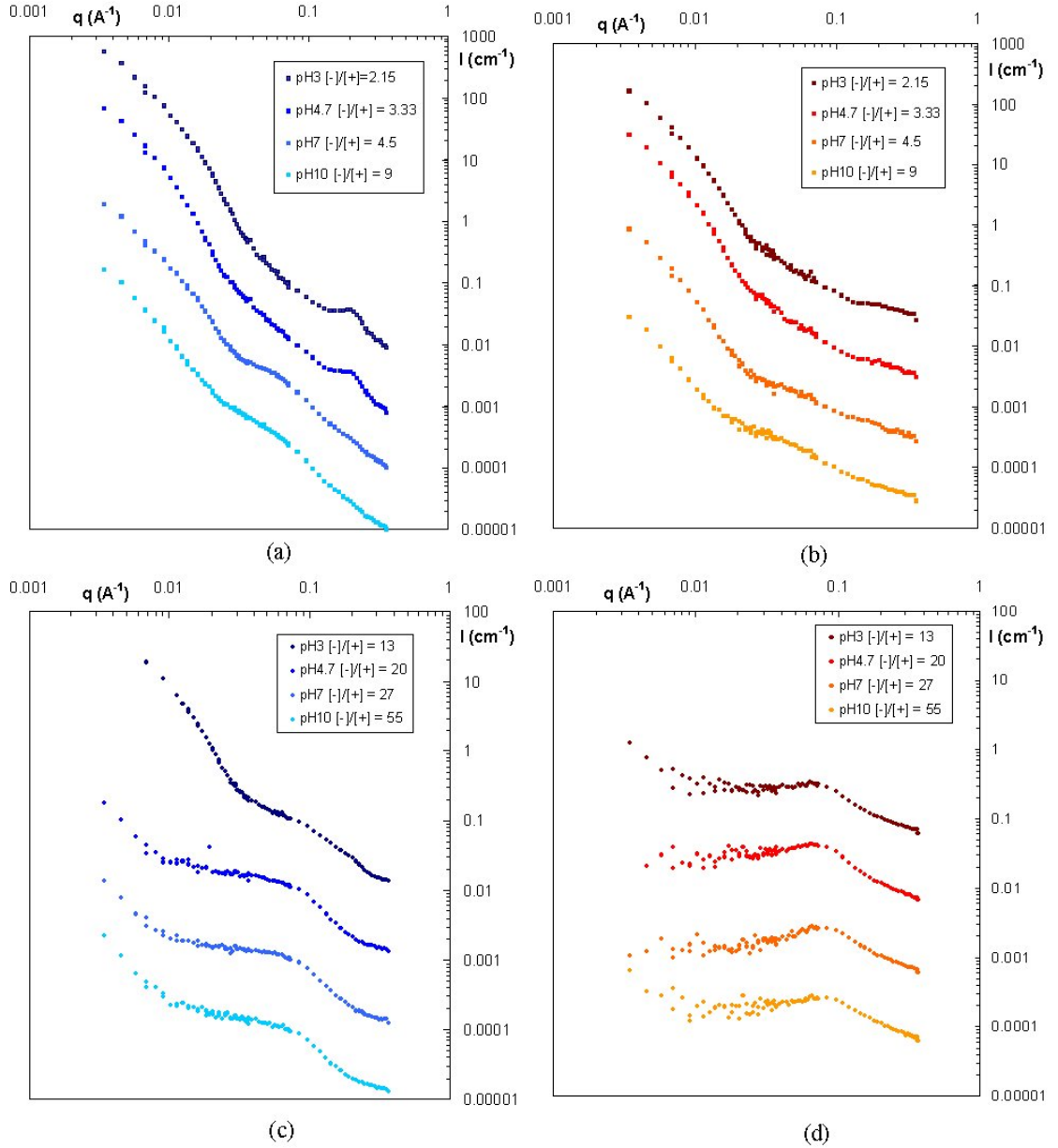


FIG. 8.14 – Courbes DNPA pour deux rapports de concentration introduits pour les pH= 3, 4.7, 7 et 10. (a) : courbes de diffusion de la protéine pour les quatre pH pour un rapport 0.1 M de PSS et 40 g/L de lysozyme décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les quatre pH pour un rapport 0.1 M de PSS et 40 g/L de lysozyme décalées d'un facteur 10. (c) : courbes de diffusion de la protéine pour les quatre pH pour un rapport 0.3 M de PSS et 20 g/L de lysozyme décalées d'un facteur 10. (d) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les quatre pH pour un rapport 0.3 M de PSS et 20 g/L de lysozyme décalées d'un facteur 10.

de dénaturation de la protéine par le PSS. Même si la densité de charge en surface est moindre ou plus élevée, c'est bien le rapport de charge introduit qui va définir la frontière de dénaturation, qui est donc simplement décalée en concentration de PSS selon le pH.

8.4.2 Variation de la densité de charge avec ajout d'hydrophobe

Nous avons dans un second temps fait varier la densité de charge sur les chaînes de PSS en utilisant des chaînes à f variable. Nous avons pour cela utilisé des chaînes de taille $N = 100$ et $N = 600$ monomères. Nous sommes resté à un rapport de concentration constant de 0.3 M de PSS et 20 g/L de lysozyme. Ainsi si le rapport de concentration d'objets reste le même, le rapport de charge introduit reste supérieur à 10 donc dans le régime dénaturé dans tous les cas.

La figure 8.15 montre les différentes courbes de diffusion pour une taille de chaîne de $N = 600$ dans les deux contrastes.

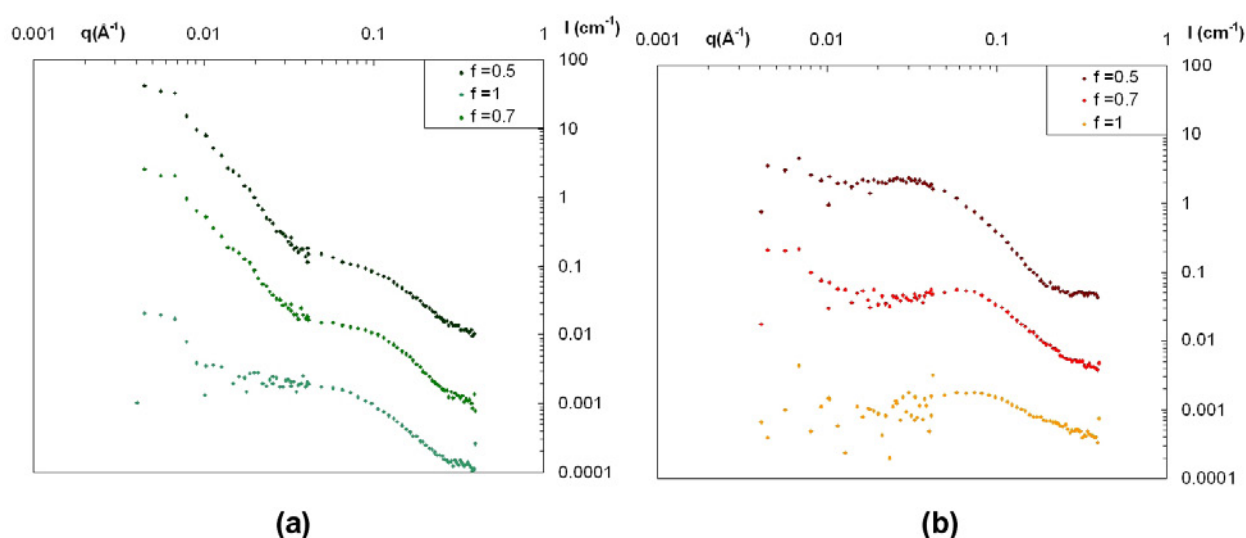


FIG. 8.15 – Courbes DNPA en fonction de f pour un PSS à $N = 600$ monomères. (a) : courbes de diffusion de la protéine pour les trois taux de charge décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les trois taux de charge séparées d'un facteur 10.

La figure 8.15 (a) montrant les signaux de protéine permet de voir que dans tous les cas la protéine est dénaturée, comme l'atteste la diffusion en $q^{-1.7}$ observée dans tous les cas à grands q . Cependant les échantillons avec des taux de charge inférieurs voient leurs signaux avoir une diffusion aux petits angles, signe que des zones hétérogènes subsistent encore. On observe également que l'épaule du signal se trouve à plus grands q lorsque le taux de charge du polyélectrolyte est plus faible. Ceci s'explique par le fait que l'écrantage électrosta-

tique du aux chaîne de PSS est plus faible avec un f faible et que donc les chaînes de protéine dépliée sont plus tendues, leur distance moyenne est donc moins élevée et l'épaulement de leur signal à plus grands q .

Pour le signal de polyélectrolyte, on observe que dans tous les cas le réseau est présent comme l'atteste la présence des pics polyélectrolytes. Leur position est décalée vers les petits q lorsque f est plus petit puisque lorsque ce taux de charge est moins important les chaînes sont moins tendues et donc la distance inter-chaîne moyenne est plus importante. (Pour rappel : $c^* \propto C^{1/2} f^{1/3}$ en régime semi-dilué). De plus lorsque le taux de charge baisse, la loi de décroissance à petits q n'est plus en q^{-1} mais augmente à mesure que f baisse.

La figure 8.16 montre les différentes courbes de diffusion pour une taille de chaîne de $N = 100$ dans les deux contrastes.

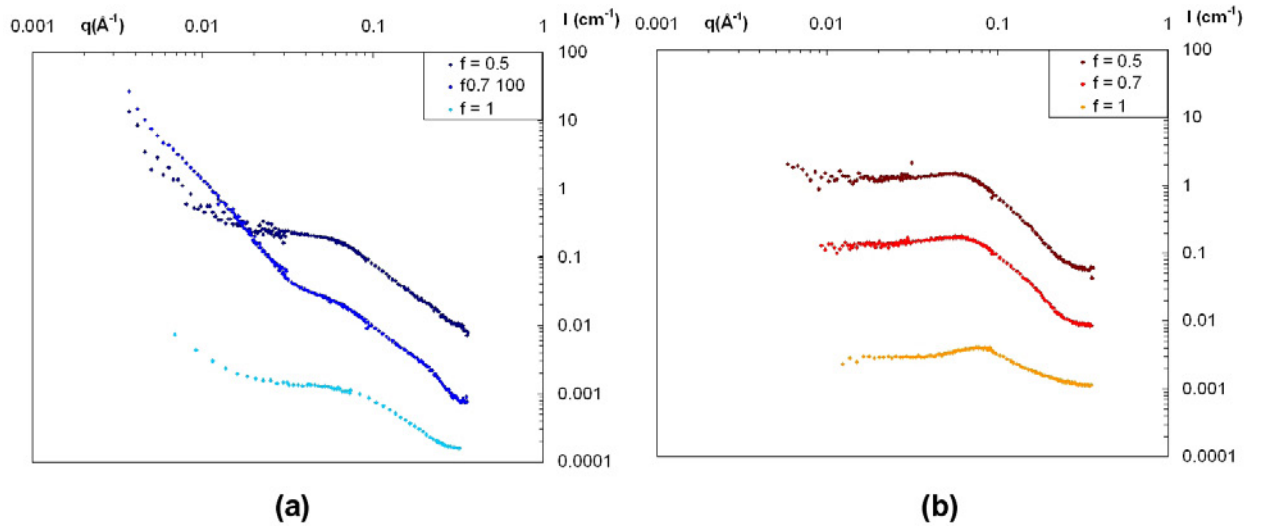


FIG. 8.16 – Courbes DNPA en fonction de f pour un PSS à $N = 100$ monomères. (a) : courbes de diffusion de la protéine pour les trois taux de charge décalées d'un facteur 10. (b) : courbes de diffusion du polyélectrolyte pour les trois taux de charge séparées d'un facteur 10.

Comme pour le cas des chaînes longues, la protéine est dénaturée dans tous les cas comme la montre les courbes de la figure 8.16 (a). Dans ce cas également la dénaturation est facilitée lorsque $f = 1$ puisque pour des taux de charge inférieurs, une diffusion à petits q est toujours visible. Pour le cas du $f = 0.7$ cette intensité est d'ailleurs si élevée qu'elle est sûrement due au fait que l'échantillon n'a pas eu le temps d'arriver à son point de pseudo-équilibre au moment de la mesure. Les signaux de polyélectrolyte sont eux similaires à ceux des chaînes longues vues ci-dessus avec un pic qui se déplace vers les petits q lorsque le taux de charge f baisse. Ici également aucune diffusion à petits q n'est visible.

Cette série de mesures a donc permis de montrer que le taux de charge variable du polyélectrolyte ne change pas la structure obtenue outre mesure. Nous aurions pu penser qu'un ajout d'unités hydrophobes sur le polyélectrolyte favoriserait la dénaturation puisque ce sont ces interactions qui sont fortement soupçonnées de causer la dénaturation de la protéine. Or c'est le phénomène inverse qui se produit puisque lorsque le taux de charge f est baissé, la dénaturation est moins complète comme le montre la présence de zones hétérogènes en protéine. Ceci est dû au fait que baisser le taux de charge tout en conservant la même concentration en polymère aboutit à faire baisser le rapport de charge introduit. Cette série d'échantillons a donc permis de montrer une fois encore que c'est ce paramètre qui gouverne la dénaturation.

8.5 Résumé

8.5.1 Conditions de dénaturation

Finalement l'étude du phénomène de dénaturation a apporté quelques réponses sur les circonstances pour lesquelles il a lieu. Nous avons en effet mis en lumière aux travers des différentes expériences présentées dans ce chapitre plusieurs paramètres déterminants.

Premièrement, la dénaturation de protéines à température ambiante semble être une propriété spécifique du PSS. En effet, nos résultats complètent ceux d'Ivinova et al.⁷⁰. ils ont montré que les polyélectrolytes abaissent la température de dépliement du lysozyme mais que seul le PSS permet la dénaturation à température ambiante. Nous avons montré de notre côté que le PSS peut dénaturer plusieurs types de protéines (lysozyme et napine) et ce d'autant plus facilement que la structure secondaire de la protéine est faible. Par ailleurs, nous avons montré que le seul motif chimique d'une unité de répétition PSS ne permet pas la dénaturation puisque le toluènesulfonate ne dénature pas le lysozyme.

Deuxièmement, nous avons montré que de fortes interactions électrostatiques initiales sont nécessaires à la dénaturation. En effet, alors qu'on aurait pu penser qu'une augmentation de l'hydrophobicité des chaînes via un abaissement du taux de sulfonation abaisse la quantité de PSS nécessaire, c'est le contraire qui est observé car le taux de charge diminue. Pour une taille de chaîne donnée, la dénaturation n'apparaît que pour un fort excès de charges négatives, pour un rapport de charge $[-]/[+]_{intro}$ indépendant du pH. Ce rapport de charge peut être abaissé par une diminution de la force ionique, comme nous l'avons vu dans le chapitre 6, car les interactions électrostatiques directes sont favorisées. Ceci est cohérent avec le fait que de fortes interactions électrostatiques ont toujours lieu avant la dénaturation, puisque les

échantillons sont toujours turbides après le mélange avant de redevenir limpides.

Enfin nous avons montré que la dénaturation est d'autant plus facilitée que les structures formées sont lâches et les protéines accessibles aux chaînes de PSS. En particulier, pour de fortes concentrations en chaînes, même les échantillons réalisés avec des chaînes courtes forment initialement un réseau de chaînes réticulées par les protéines dans lesquels ces dernières sont accessibles. Puisque la dénaturation est un phénomène cinétique qui n'intervient que lorsque les unités répétitives de PSS interagissent fortement avec les protéines, elle est favorisée quand les chaînes de PSS peuvent diffuser librement dans les structures initiales. Celles-ci sont, pour un rapport de charge donné, d'autant moins denses que les chaînes utilisées sont longues.

8.5.2 Proposition d'un mécanisme de dénaturation

Nous proposons finalement que les fortes interactions électrostatiques permettent de mettre en contact les zones hydrophobes des protéines avec le groupement phényl des monomères de PSS. En effet, bien que le PSS soit parfaitement soluble, ce groupe a souvent été considéré comme un site potentiel pour les interactions hydrophobes, comme par exemple par Essafi et al.⁹⁹. Lorsque le rapport $[-]/[+]_{intro}$ est suffisamment élevé, le nombre d'unités de PSS est assez important pour mettre en contact certaines unités avec les sites hydrophobes des protéines. Des réorganisations lentes permettent finalement aux groupes phényl d'interagir avec ces sites et de stabiliser des conformations dénaturées de protéines. Une telle mise en contact n'est possible qu'avec des chaînes, les contraintes du squelette forçant les groupements phényl à accéder à la surface des protéines. Le rapport seuil de transition peut être le seuil au dessus duquel la protéine est recouverte par assez d'unités SS. La longueur de persistance des chaînes ne semble pas avoir d'effet sur la dénaturation puisque seul le rapport de charge et non la concentration en chaînes (qui modifie sa propre longueur de persistance) détermine si la dénaturation a lieu ou non. Ivina et al.⁷⁰ concluent à l'inverse que la rigidité des chaînes la capacité de dénaturation, mais cependant dans leur travaux la capacité de dénaturation du lysozyme par les différents polyélectrolyte suit leur degré d'hydrophobicité, renforçant ainsi notre hypothèse sur l'hydrophobicité comme moteur de la dénaturation.

[99] Essafi, W. *Thèse de doctorat* **1996**, .

Chapitre 9

Conclusion

9.1 Résultats principaux

La première remarque à faire une fois tous ces résultats exposés, est que le choix du système s'est avéré très heureux. Même si nous avons fait en sorte de choisir des composants adaptés pour l'étude, nous ne pouvions pas à priori prévoir la très grande reproductibilité des résultats d'une campagne d'expérience à l'autre. Du fait du nombre important de paramètres sondés (pH, force ionique, taux de sulfonation, concentration totale en objets...), différents produits ont été utilisés ce qui aurait pu induire des difficultés. Notamment l'utilisation de différents tampons pH, ou de différents PSS synthétisés à chaque fois en fonction du paramètre voulu (longueur de chaîne, taux de sulfonation, contre-ion associé, marquage isotopique) ne s'est pas avérée source de phénomènes parasites. De plus nous avons vu que nous avons eu dans tous les cas une stabilité suffisante pour effectuer les mesures (longues en DNPA) après le temps nécessaire à l'obtention d'un état de pseudo-équilibre (métastable).

Le marquage isotopique, systématiquement effectué, associé à des objets ayant une diffusion intrinsèque importante a permis d'avoir un signal de diffusion important et donc des courbes très propres et précises qui ont pu être exploitées de manière à en extraire des informations précises structurales et conformationnelles sur les assemblages formés. On notera que ces résultats n'ont pas demandé un temps de faisceau excessif (environ 15 jours par an répartis sur 3 réacteurs).

Ceci nous a permis de définir trois structures dans notre système de manière extrêmement précise. Ces structures étant toujours obtenues après un mélange direct instantané de deux solutions contenant chacun des composés à une concentration fixée.

Gel réticulé

La première structure, intermédiaire entre les deux autres, est le gel réticulé. Il s'agit en effet d'une structure où le réseau originellement formé par le polyelectrolyte en solution est conservé (mais contracté) et figé en gel par la protéine qui relie les chaînes entre elles en créant des points d'ancrage. Nous avons montré pour cette structure :

- que la distribution des chaînes de PSS reste homogène.
- grâce à la détermination de la conformation des chaînes, que les chaînes de PSS sont contractées localement et donc voient leur longueur de persistance l_p être abaissée après contact avec la protéine.
- que les protéines conservent leur conformation native.
- que les protéines sont distribuées de façon hétérogène en suivant une distribution fractale de dimension 2.5.

La différence importante entre les signaux des deux espèces dans cette structure montre bien l'importance du marquage isotopique et sa puissance pour déterminer la distribution de deux espèces dans une structure commune.

Deux conditions sont nécessaires pour obtenir cette structure :

- le PSS doit être en régime semi-dilué après interaction avec la protéine.
- le rapport de charge introduit (rapport entre le nombre de charges positives apportées par la protéine et le nombre de charges négatives apportées par le polyelectrolyte) doit rester proche de 1.

Partant de cette structure gel, deux autres structures sont accessibles si un paramètre seuil est franchi.

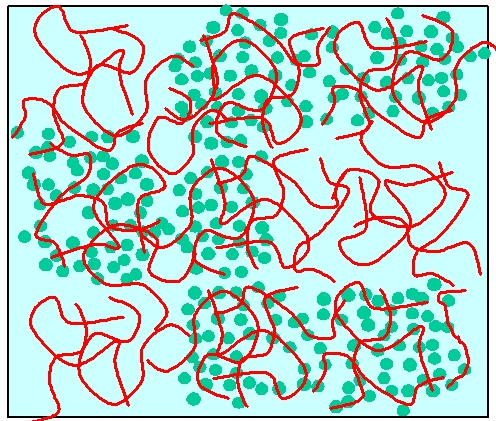


FIG. 9.1 – Représentation schématique de la structure gel.

Globules denses

Une seconde structure observée est une agrégation des objets en globules denses, ces globules étant formés d'amas de protéines au contact les uns des autres entremêlées avec des chaînes de PSS. Nous avons montré que l'on obtient des globules denses lorsque le PSS se trouve en régime dilué après interaction avec la protéine. Ainsi cette structure est observée :

- lorsque le PSS se trouve en régime dilué avant le mélange.
- lorsque la concentration passe sous le c^* qui augmente du fait de la baisse de la longueur de persistance l_p des chaînes de PSS après interaction avec la protéine.
- lorsque la force ionique de la solution est augmentée, l_p variant également en fonction de celle-ci. Cette structure peut être obtenue à partir d'un gel déjà formé en ajoutant du sel à posteriori.

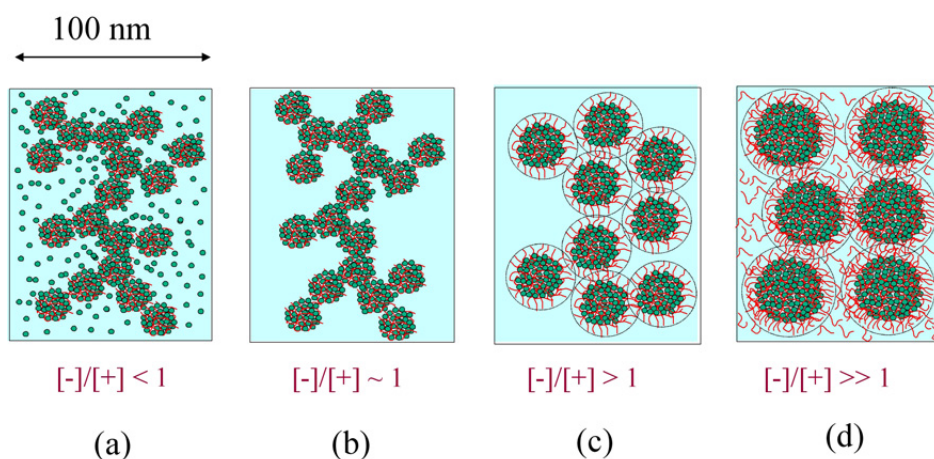


FIG. 9.2 – Représentation schématique de la structure globulaire.

Un ajustement précis des courbes de DNPA par un modèle de sphères dures a été possible lorsque les globules formés étaient assez denses et possédaient une forme suffisamment définie. Les ajustements nous ont permis d'obtenir les données suivantes sur la forme, la structure et la composition interne des globules :

- les globules formés sont de taille bien définie et ont une faible polydispersité. Cette taille montre une variation unique avec la longueur de Debye et donc avec la force ionique de la solution.
- le rapport de charge interne des globules reste toujours proche de 1, les espèces en excès restent libres en solution. Ils ont cependant une charge de surface effective dont le signe correspond à l'espèce introduite en excès.
- lorsque le rapport de charge introduit est supérieur à 1, alors les complexes possèdent une couronne de polymère.

- les globules sont très denses, la fraction volumique interne se situe entre 25 et 35 % alors que la fraction volumique totale de matière introduite est de 4 % en général. Cette densité varie avec la longueur des chaînes de PSS et la force ionique.

- les globules s'agrègent à plus grande échelle en organisation fractale de dimension 2.1 qui correspond à un mode d'agrégation de type Reaction Limited Colloidal Aggregation.

Nous avons de plus montré grâce à une expérience de marquage isotopique des contre-ions des chaînes de PSS que ceux-ci sont expulsés du coeur des complexes, phénomène qui était proposé dans la littérature mais n'avait jamais été montré.

Réseau mixte

Une dernière structure apparaît lorsque le contact entre polyélectrolytes et protéines est favorisé. Dans ce cas, il y a dénaturation de la protéine par le PSS aboutissant à un réseau mixte en solution de chaînes libres. Cette dénaturation a lieu lorsque :

- le rapport de charge introduit est supérieur à une valeur limite qui dépend de la taille des chaînes : des longueurs plus importantes créant une structure plus lâche, un rapport plus faible est nécessaire. Si le PSS est ajouté après formation de globules, cette valeur limite est plus élevée.

- la force ionique du milieu est abaissée.

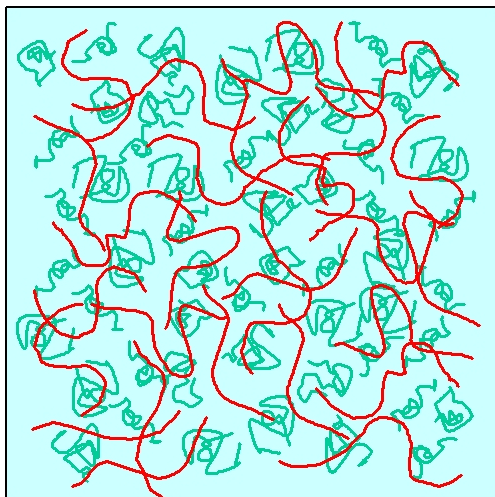


FIG. 9.3 – Représentation schématique de la structure réseau mixte.

Nous avons proposé un mécanisme de dénaturation. La dénaturation serait due au contact entre les zones hydrophobes de la protéine et les groupement phenyl du PSS, également hydrophobes. Il est nécessaire que ces groupements soient liés par une chaîne pour forcer ces zones à entrer en contact, en effet nous avons vu que l'utilisation d'un composé chimiquement similaire mais non polymérique (le toluènesulfonate) ne mène pas à la dénaturation de la

protéine.

La possibilité de faire varier un nombre important de paramètres et le choix de ce système nous a donc permis de bien définir les structures obtenues ainsi que les frontières entre chacun des régimes et de proposer des mécanismes menant à la formation d'une des trois structures. Le choix d'un système PSS-lysozyme apparaît donc judicieux et il peut finalement être considéré comme un bon modèle des systèmes polyélectrolyte-protéine en général.

9.2 Perspectives

Du fait du nombre élevé d'informations que nous avons pu dégager de l'étude des interactions entre le PSS et le lysozyme, il reste peu de mesures supplémentaires de ce type encore à faire sur ce système. Seule la compréhension des mécanismes de dénaturation reste à approfondir et d'autres techniques que la diffusion de neutrons seront sûrement nécessaires afin d'y parvenir.

Par contre, les connaissances acquises nous permettent désormais de parfaitement contrôler la structure formée par le mélange de PSS et de lysozyme. Nous pouvons notamment décider de former un gel ou des globules denses, et pour ces derniers contrôler leur taille et leur compacité. Cette possibilité de contrôle rend possible des applications du système dans des domaines variés tels que l'agro-alimentaire ou les biotechnologies. Un exemple concret d'application serait le greffage de lysozyme sur des surfaces pour des bio-puces. Jusqu'ici ces greffages consistaient à inclure directement des protéines dans des multicouches ; cependant pour le lysozyme il y a un risque de dénaturation. Avec le système que nous venons d'étudier il serait donc possible de greffer des complexes sur des surfaces de PSS ou de PAH suivant leur charge de surface, ces complexes aidant à la stabilité de la protéine et augmentant la surface spécifique susceptible d'être réactive (voir figure 9.4).

Nous avons réalisé un tel greffage et avons tenté d'en mesurer l'épaisseur par réflectivité de neutrons. Nous avons choisi un rapport $[-]/[+]_{intro} = 0.8$ et n'avons pas éliminé les protéines libres en excès. Nous avons alors mesuré une fine épaisseur correspondant à une couche de protéines libres qui ont saturé la surface, empêchant le greffage des complexes. Ce greffage nécessiterait donc une plus grande précaution de préparation mais, si il est réussi, alors si serait possible ensuite de piloter l'accessibilité au coeur des globules pour des molécules via la compacité. Le seul facteur limitant pour des applications éventuelles est de savoir si la protéine, étant une enzyme, reste active au coeur des complexes. Nous avons pour cela effectué un test d'activité enzymatique sur une série d'échantillons globulaires, présentée en figure 9.5. Nous avons choisi une série de deux globules très denses avec et sans couronne et

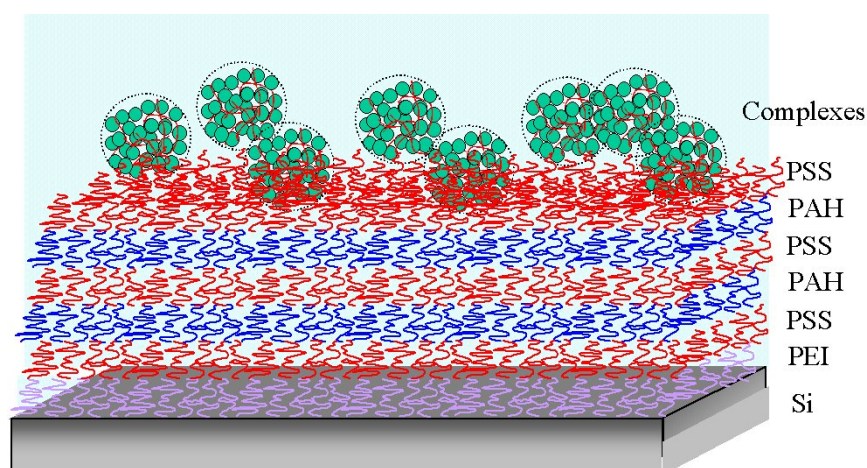


FIG. 9.4 – Schéma de greffage de complexes à surface chargée positivement sur des multicouches polyélectrolytes terminée par une couche PSS.

deux globules moins denses avec et sans couronne également. L'activité de ces structures a été comparée à celle d'une solution de lysozyme seul (une même concentration en lysozyme a été utilisée pour chacun des échantillons). Cette figure montre que le lysozyme reste bien actif au coeur des complexes, quoique moins que le lysozyme seul, et que son activité est fonction des paramètres des globules. En guise de récompense ludique pour l'effort de lecture, nous vous laissons le soin de trouver les correspondances entre chacune des structures et les courbes d'activités (Réponse en bas de page¹).

¹1-a; 2-b; 3-d; 4-c

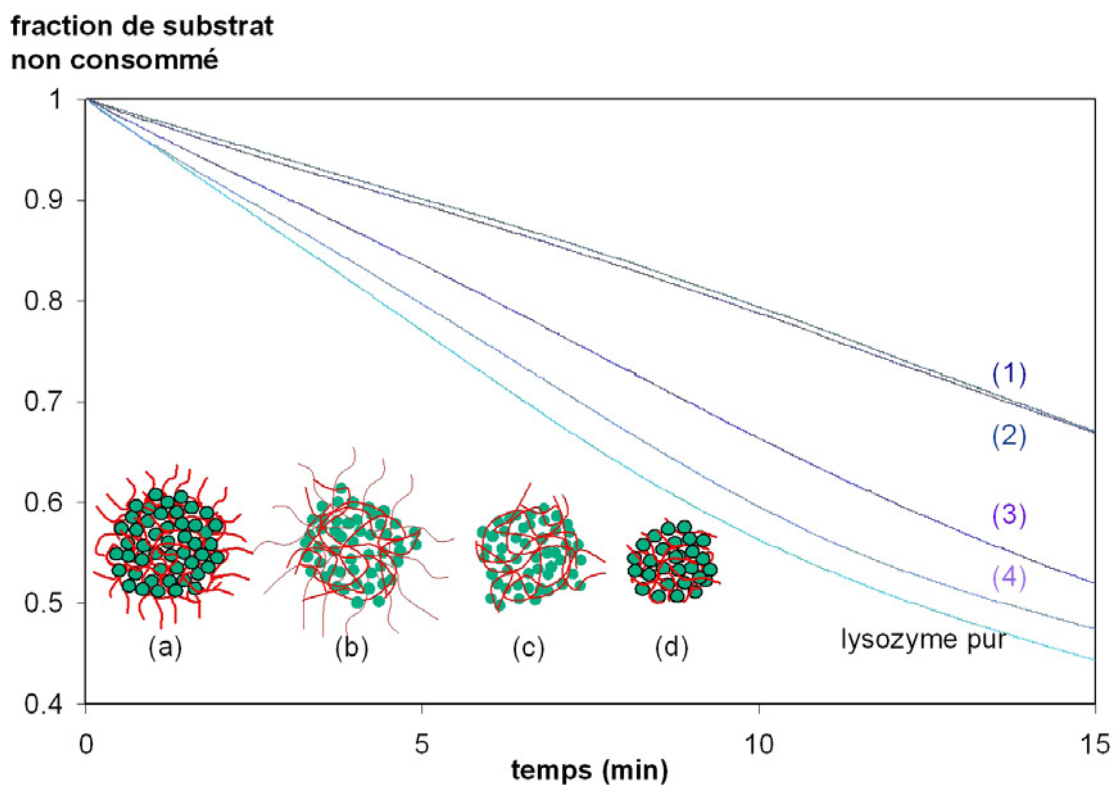


FIG. 9.5 – Activités enzymatiques pour quatre structures comparées à l'activité du lysozyme seul. Courbe de consommation d'un substrat par le lysozyme en fonction du temps. (a) : globule peu dense avec couronne ($N = 800$, $[-]/[+]_{intro} = 1.66$). (b) : globule très dense avec couronne ($N = 100$, $[-]/[+]_{intro} = 1.66$). (c) : globule peu dense sans couronne ($N = 800$, $[-]/[+]_{intro} = 1$). (d) : globule très dense sans couronne ($N = 100$, $[-]/[+]_{intro} = 1$). Courbes mesurées par Christelle Cassan et Sophie Combet (LLB), les échantillons ont été préparés deux fois chacun et ont montré une parfaite reproductibilité.

Bibliographie

- [1] G.S. Manning. *J. Chem. Soc.*, 73 :924 et 934, 1949.
- [2] K. Nishida, K. Kaji, and T. Kanaya. Charge density dependance of correlation length due to electrostatic repulsion in polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*, 28 :2472–2475, 1995.
- [3] W. Essafi, F. Lafuma, and C.E. Williams. Structural evidence of charge renormalization in semi-dilute solutions of highly charged polyelectrolytes. *European Physical Journal B*, 9(2) :261–266, 1999.
- [4] A.R. Khokhlov. On the collapse of weakly charged polyelectrolytes. *J. PHYS. A*, 13 :979–987, 1980.
- [5] A. Dobrynin, R. H. Colby, and M. Rubinstein. Scaling theory of polyelectrolyte solutions. *macromolecules*, 28 :1859–1871, 1995.
- [6] P. Pfeuty. Conformations des polyélectrolytes-ordre dans les solutions de polyélectrolytes. *Journal De Physique*, 39 :149, 1978.
- [7] P.G. deGennes, P. Pincus, R. M. Velasco, and F. Brochard. Remarks on polyelectrolyte conformation. *J. Phys.*, 51 :503, 1976.
- [8] T. Odijk. Polyelectrolytes near rod limit. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 15(3) :477–483, 1977.
- [9] J. Skolnick and M. Fixman. Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules*, 10(5) :944–948, 1977.
- [10] J.-L. Barrat and J.-F. Joanny. Persistence length of polyelectrolyte chains. *Europhysics Letters*, 24 :333, 1993.
- [11] Damien Baigl, T.A.P.Seery, and C.E. Williams. Preparation and characterization of hydrosoluble, partially charged poly(styrenesulfonate)s of various controlled charge fractions and chain lengths. *Macromolecules*, 35 :2318–2326, 2001.
- [12] H.S. Makowski, R.D. Lundberg, and G.S. Singhal. *Exxon Research and Engineering Company*, U.S. Patent 3 870 841, 1975.

-
- [13] H. Vink. A new convenient method for the synthesis of poly(styrenesulfonic acid). *Makromol. Chem.*, 182 :279, 1980.
- [14] <http://fr.wikipedia.org>.
- [15] <http://www.rscb.org/pdb>.
- [16] A.J. Sophianopoulos and K.E. VanHolde. Physical studies of muramidase (lysozyme). ii : ph dependent dimerization. *J. Bio. Chem.*, 239 :2516, 1964.
- [17] O. Vidal. Cristallogénèse d'un lysozyme en gel d'agarose et en gel de silice. *Thèse de doctorat Université Paris VI*, 1996.
- [18] J.L. Xia and P.L. Dubin. Protein-polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, 1994.
- [19] V.B. Tolstoguzov. Protein-polysaccharide interactions. *Food science technologies*, 80 :171–198, 1997.
- [20] J.L. Doublier, C. Garnier, D. Renard, and C. Sanchez. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5 :202–214, 2000.
- [21] C. Tribet. Complexation between amphiphilic polyelectrolytes and proteins : from necklaces to gels. *Surfactant science series*, 2001.
- [22] C.L. Cooper, P.L. Dubin, A.B. Kayitmazer, and S. Turksen. Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10 :52–78, 2005.
- [23] H. Morawetz and W.L. Hugues. Interactions of proteins with synthetic polyelectrolytes : I. complexing of bovine serum albumin. *J. Phys. Chem.*, 56 :64–69, 1952.
- [24] H. Morawetz and H. Sage. The effect of poly(acrylic acid) on the tryptic digestion of hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 :103–109, 1955.
- [25] D.E. Parker, C.E. Glatz, C.F. Ford, S.M. Gendel, I. Suominen, and M.A. Rougvie. Recovery of a charged-fusion protein from cell extracts by polyelectrolyte precipitation. *Biotech. Bioeng.*, 36 :467–475, 1990.
- [26] A.L. Margolin, S.F. Shertyuk, V.A. Izumrudov, A.B. Zezin, V.A. Kabanov, and A.N. Belozersky. Enzymes in polyelectrolyte complexes. *European Journal of Biopolymers*, 146 :625–632, 1985.
- [27] K. Kassapidou, W. Jesse, M.E. Kuil, A. Lapp, S. Egelhaaf, and J.R.C. Van der maarel. Structure and charge distribution in dna and poly(styrenesulfonate) aqueous solutions. *Macromolecules*, 30 :2671–2684, 1997.
- [28] E. Raspaud, M. Olvera de la cruz, J.L. Sikorav, and F. Livolant. Precipitation of dna by polyamines : a polyelectrolyte behavior. *Biophysical journal*, 74 :381–393, 1998.

-
- [29] Y. Matsuzawa, T. Kanbe, and K. Yoshikawa. Compaction and multiple chain assembly of dna with the cationic polymer poly(aluminium chloride) (pac). *Langmuir*, 2004.
- [30] A. Eremenko, I. Kurochkin, S. Chernov, A. Barmin, A. Yaroslavov, and T. Moskvitina. Monomolecular enzyme films stabilized by amphiphilic polyelectrolytes for biosensors devices. *Thin solid films*, 260 :212–216, 1995.
- [31] S. Azegami, A. Tsuboi, T. Izumi, M. Hirata, P.L. Dubin, B. Wang, and E. Kokufuta. Formation of an intrapolymer complex from human serum albumin and poly(ethylene glycol). *Langmuir*, 15 :940–947, 1999.
- [32] T. Matsudo, K. Ogawa, and E. Kokufuta. Complex formation of protein with different water- soluble synthetic polymers. *Biomacromolecules*, 4 :1794–1799, 2003.
- [33] Jeff Y. Gao, Paul L. Dubin, and Barry B. Muhoberac. Capillary electrophoresis and dynamic light scattering studies of structure and binding characteristics of protein-polyelectrolyte complexes. *J. Phys. Chem. B*, 102 :5529–5535, 1998.
- [34] Atsushi Tsuboi, Tsuyoshi Izumi, Mitsuo Hirata, Jiulin Xia, Paul L. Dubin, and Etsuo Kokufuta. Complexation of proteins with a strong polyanion in an aqueous salt-free system. *Langmuir*, 12 :6295–6303, 1996.
- [35] E. Kokufuta. Complexation of proteins with polyelectrolytes in a salt-free system and biochemical characteristics of the resulting complexes. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, pages 301–325, 1994.
- [36] Jiulin Xia, Paul L. Dubin, Yesook Kim, Barry B. Muhoberac, and Valentine J. Klimkowski. Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein-polyelectrolyte complexes. *J. Phys. Chem.*, 97 :4528–4534, 1993.
- [37] J.M. Park, B.B. Muhoberac, P.L. Dubin, and J. Xia. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules*, 25 :290–295, 1992.
- [38] K. Kaibara, T. Okazaki, H.B. Bohidar, and P.L. Dubin. ph-induced coacervation in complexes of bovine serum albumin and cationic polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 1 :100–107, 2000.
- [39] T. Perkins, D. Mak, T. Root, and E. Lightfoot. Protein retention in hydrophobic interaction chromatography : modeling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity. *J. Chrom.*, 766 :1–14, 1997.
- [40] T. Sato, K. W. Mattison, P. L. Dubin, M. Kamachi, and Y. Morishima. Effect of protein aggregation on the binding of lysozyme to pyrene-labeled polyanions. *Langmuir*, 14(19) :5430–5437, 1998.

-
- [41] C. Tribet, I. Porcar, P. A. Bonnefont, and R. Audebert. Association between hydrophobically modified polyanions and negatively charged bovine serum albumin. *Journal of Physical Chemistry B*, 102(7) :1327–1333, 1998.
- [42] V. Ball, M. Winterhalter, P. Schwinte, Ph. Lavalle, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. Complexation mechanism of bovine serum albumin and poly(allylamine hydrochloride). *J. Phys. Chem. B*, 106 :2357–2364, 2002.
- [43] C. Le Bon, T. Nicolai, and D. Durand. Kinetics of aggregation and gelation of globular proteins after heat-induced denaturation. *Macromolecules*, 32(19) :6120–6127, 1999.
- [44] R. Borrega, C. Tribet, and R. Audebert. Reversible gelation in hydrophobic polyelectrolyte/protein mixtures : An example of cross-links between soft and hard colloids. *Macromolecules*, 32(23) :7798–7806, 1999.
- [45] P. L. Dubin, J. Gao, and K. Mattison. Protein-purification by selective phase-separation with polyelectrolytes. *Separation and Purification Methods*, 23(1) :1–16, 1994.
- [46] C. K. Trinh and W. Schnabel. Ionic-strength dependence of the stability of polyelectrolyte complexes - its importance for the isolation of multiply-charged polymers. *Angewandte Makromolekulare Chemie*, 212 :167–179, 1993.
- [47] C. G. de Kruif, F. Weinbrecka, and R. de Vriesc. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9 :340–349, 2004.
- [48] P. Chodanowski and S. Stoll. Polyelectrolyte adsorption on charged particles in the debye-hückel approximation. a monte carlo approach. *Macromolecules*, 34 :2320–2328, 2001.
- [49] S. Stoll and P. Chodanowski. Polyelectrolyte adsorption on an oppositely charged spherical particle. chain rigidity effects. *macromolecules*, 35 :9556–9562, 2002.
- [50] S. Ulrich, A. Laguerir, and S. Stoll. Complexation of a weak polyelectrolyte with a charged nanoparticle. solution properties and polyelectrolyte stiffness influences. *Macromolecules*, 38 :8939–8949, 2005.
- [51] R. R. Netz and J. F. Joanny. Adsorption of semiflexible polyelectrolytes on charged planar surfaces : Charge compensation, charge reversal, and multilayer formation. *Macromolecules*, 32(26) :9013–9025, 1999.
- [52] M. Jonsson and P. Linse. Polyelectrolyte-macroion complexation. ii. effect of chain flexibility. *Journal of Chemical Physics*, 115(23) :10975–10985, 2001.
- [53] M. Skepo and P. Linse. Complexation, phase separation, and redissolution in polyelectrolyte-macroion solutions. *Macromolecules*, 36 :508–519, 2003.

-
- [54] F. Carlsson, M. Malmsten, and P. Linse. Protein-polyelectrolyte cluster formation and redissolution : A monte carlo study. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(10) :3140–3149, 2003.
- [55] N.A. Peppas and W. Leobandung. Stimuli-sensitive hydrogels : ideal carriers for chronobiology and chronotherapy. *J. Biomat. Sci.*, 15(2) :125–144, 2004.
- [56] L.E. Bromberg and E.S. Ron. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Advanced Drug Delivery*, 31(3) :197–221, 1998.
- [57] T.D. Gibson, B.L.J. Pierce, J.N. Hulbert, and S. Gillespie. Improvements in the stability characteristics of biosensors using protein-polyelectrolyte complexes. *Sensors and Actuators B*, 33 :13–18, 1996.
- [58] N.A. Chaniotakis. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 :89 – 95, 2004.
- [59] A. Yu and F. Caruso. Thin films of polyelectrolyte-encapsulated catalase microcrystals for biosensing. *Analytical Chemistry*, 75 :3031–3037, 2003.
- [60] F. Caruso, H. Fiedler, and K. Haage. Assembly of b-glucosidase multilayers on spherical colloidal particles and their use as active catalysts. *Colloids and Surfaces A*, 169 :287–293, 2000.
- [61] V.A. Izumrudov, I.Y. Galaev, and B. Mattiasson. Polycomplexes-potential for bioseparation. *Bioseparation*, 7 :207–220, 1998.
- [62] M.B. Dainiak, V.I. Muronetz, V.A. Izumrudov, I.Y. Galaev, and B. Mattiasson. Production of fab fragments of monoclonal antibodies using polyelectrolyte complexes. *Analytical Biochemistry*, 277 :58–66, 2000.
- [63] P. Lindner. Neutron, x-ray and light scattering applied to soft condensed matter. *North Holland, édité par P. Lindner et T. Zemb*, page 23, 2002.
- [64] J. P. Cotton. Small-angle neutron scattering : Introduction and variations on contrast. *Journal De Physique Iv*, 9(P1) :21–49, 1999.
- [65] J. Combet, F. Isel, M. Rawiso, and F. Boue. Scattering functions of flexible polyelectrolytes in the presence of mixed valence counterions : Condensation and scaling. *Macromolecules*, 38(17) :7456–7469, 2005.
- [66] D. Russo, D. Durand, M. Desmadril, and P. Calmettes. Study of thermally and chemically unfolded conformations of a small β -protein by means of small-angle neutron scattering. *Physica B*, 276-278 :520–521, 2000.

-
- [67] P. Calmettes, D. Durand, M. Desmadril, P. Minard, V. Receveur, and J.C. Smith. How random is a highly denatured protein? *Biophys. Chem.*, 53(1-2) :105–113, 1994.
- [68] J.H.E. Hone, A.M. Howe, and T. Cosgrove. A small-angle neutron scattering study of the structure of gelatin/polyelectrolyte complexes. *Macromolecules*, 33 :1206–1212, 2000.
- [69] A. Stenstam, A. Khan, and H. Wennerström. The lysozyme-sds system. an example of protein-surfactant aggregation. *Langmuir*, 17(24) :7513–7520, 2001.
- [70] O.N. Ivinova, V.A. Izumrudov, V.I. Muronetz, I.Y. Galaev, and B. Mattiasson. Influence of complexing polyanions on the thermostability of basic proteins. *Macromolecular bioscience*, 3-4 :210–215, 2003.
- [71] M.N. Spiteri, F. Boué, A. Lapp, and J.P. Cotton. Persistence length for a pssna polyion in semidilute solution as a function of the ionic strength. *Physical review letters*, 77(26) :5218–5220, 1996.
- [72] E. Dubois and F. Boue. Conformation of poly(styrenesulfonate) polyions in the presence of multivalent ions : Small-angle neutron scattering experiments. *Macromolecules*, 34 :3684–3697, 2001.
- [73] D. Stauffer, A. Coniglio, and M. Adam. Gelation and critical phenomena. *Adv. Polymer Sci.*, 44 :103, 1982.
- [74] K. P. Wilson, B. A. Malcolmgll, and B. W. Matthews. Structural and thermodynamic analysis of compensating mutations within the core of chicken egg white lysozyme. *J. Bio. Chem.*, 267(15) :10842–10849, 1992.
- [75] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim.*, 68 :1106–1123, 1949.
- [76] P. Sharp and V.A. Bloomfield. Light scattering from wormlike chains with excluded volume effects. *biopolymers*, 6 :1201–1211, 1968.
- [77] J. des Cloizeaux. Form factor of an infinite kratky-porod chain. *Macromolecules*, 6(3) :403, 1973.
- [78] A. Brûlet, F. Boué, and J.P. Cotton. About the experimental determination of the persistence length of wormlike chains of polystyrene. *J. Phys. II*, 6(6) :885–891, 1996.
- [79] M. Y. Lin, H. M. Lindsay, D.A. Weitz, R. C. Ball, R. Klein, and P. Meakin. Universal reaction limited colloid aggregation. *Physical review A*, 41(4) :2005–2020, 1990.
- [80] M. Y. Lin, H. M. Lindsay, D. A. Weitz, R. Klein, R. C. Ball, and P. Meakin. Universal diffusion-limited colloid aggregation. *J. Phys. : Condens. Matter*, 2 :3093–3113, 1990.

-
- [81] C.E. Williams, M. Nierlich, J.P. Cotton, G. Jannink, F. Boué, M. Daoud, B. Farnoux, C. Picot, P.G. deGennes, M. Rinaudo, M. Moan, and C. Wolff. Polyelectrolyte solutions : Intrachain and interchain correlations observed by sans. *Journal of Polymer Science : Polymer Letters Edition*, 17(6) :379–384, 1979.
- [82] B. Cabane. Growth : a brief guide for the use of scattering techniques. *Neutron, X-Ray and Light Scattering, North-Holland, Delta Series, Elsevier Science Publisher*, page 247, 1991.
- [83] G.S. Manning. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solution. 1 :colligative properties. *J. Chem. Phys.*, 51(3) :924–938, 1969.
- [84] S. Rosenfeldt, A. Wittemann, M. Ballauff, E. Breininger, J. Bolze, and N. Dingenouts. Interaction of proteins with spherical polyelectrolyte brushes in solution as studied by small-angle x-ray scattering. *Physical review E*, 70 :061403, 2004.
- [85] Denis Fenistein, Loïc Barré, Daniel Broseta, Didier Espinat, Armand Livet, Jean-Noël Roux, and Marco Scarsella. Viscosimetric and neutron scattering study of asphaltene aggregates in mixed toluene/heptane solvents. *Langmuir*, 14 :1013–1020, 1998.
- [86] M. Kallala, R. Jullien, and B. Cabane. Crossover from gelation to precipitation. *J. Phys. II France*, 2 :7–25, 1992.
- [87] D.A. Weitz, J.S. Huang, M.Y. Lin, and J. Sung. Limits of the fractal dimension for irreversible kinetic aggregation of gold colloids. *Physical review letters*, 54(13) :1416–1419, 1985.
- [88] D. Baigl, M. Sferrazza, and C. E. Williams. On the pearl size of hydrophobic polyelectrolytes. *Europhysics Letters*, 62(1) :110–116, 2003.
- [89] <http://biophysics.cs.vt.edu/H++/>.
- [90] B.V. Derjaguin and L. Landau. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta physicochim URSS*, 14 :633–662, 1941.
- [91] E.J.W. Verwey and J.T.G. Overbeek. Theory of the stability of lyophobic colloids. *Elsevier, Amsterdam*, 1948.
- [92] J. Israelachvili. Intermolecular and surface forces. *Academic press*, 1992.
- [93] MM Ries-Kautt and AF Ducruix. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 264(2) :745–748, 1989.
- [94] P. Schwinte, V. Ball, B. Szalontai, Y. Haikel, J.C. Voegel, and B. Schaaf. Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 3 :1135–1143, 2002.

- [95] Liu Huizhou, Yang Weijing, and Chen Jiayong. Effects of surfactants on emulsification and secondary structure of lysozyme in aqueous solutions. *Biochemical Engineering Journal*, 2(3) :187–196, 1998.
- [96] M. D. Lad, V. M. Ledger, B. Briggs, R. J. Green, and R. A. Frazier. Analysis of the sds-lysozyme binding isotherm. *Langmuir*, 19(12) :5098–5103, 2003.
- [97] I. Schmidt. Structures et propriétés tensioactives des assemblages complexes protéines basiques / pectines. *Thèse de doctorat Université Nantes*, 2004.
- [98] P. G. Vekilov, L. A. Monaco, B. R. Thomas, V. Stojanoff, and F. Rosenberger. Repartitioning of nacl and protein impurities in lysozyme crystallization. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 52 :785–798, 1996. Part 4.
- [99] W. Essafi. Structure des polyélectrolytes fortement chargés. *Thèse de doctorat*, 1996.

Structures et mécanismes de formation de complexes polyélectrolytes–protéines

Les mécanismes régissant la formation de complexes constitués de chaînes polymères chargées (polyélectrolytes) et de protéines, rencontrés dans l'agro-alimentaire, la pharmacologie ou la biologie, mènent à des structures mal connues jusqu'ici. Nous les avons étudiées par Diffusion de Neutrons aux Petits Angles (DNPA), associée au marquage par deutériation du polymère et à la variation de contraste dans des mélanges eau lourde - eau légère. La protéine est le lysozyme (chargé positivement à $\text{pH} < 11$) et le polyélectrolyte le polystyrène sulfonate (PSS, toujours chargé négativement) ; le rapport des charges apportées ($[-]/[+]$) est un paramètre essentiel. Lorsqu'il est proche de 1, on obtient soit un gel de PSS réticulé par les protéines, qui contractent partiellement les chaînes de PSS, tout en les laissant en régime interpénétré (semi dilué), soit des globules denses (rayon ~ 10 nm) avec agrégation fractale à plus grande échelle lorsque, après contraction, les chaînes sont trop courtes et passent en régime désinterpénétré (dilué). Cette structure très bien définie a permis une étude fouillée: nous avons montré que le cœur des globules possède une charge nulle, que les espèces introduites en excès du point de vue électrostatique restent en solution, éventuellement dans des couronnes pour le PSS, et que leur taille finie est fixée par la force ionique. Une mesure spécifique de la localisation des contre-ions a prouvé qu'ils sont expulsés du cœur des complexes lors de leur formation. La conformation des chaînes au sein des complexes a été mesurée par marquage adapté. Enfin lorsque $[-]/[+] \gg 1$, un réseau transitoire fluide et limpide de protéines dénaturées par le PSS est obtenu.

Structures and formation mechanisms of polyelectrolyte-protein complexes

The mechanisms driving the formation of complexes made of charged polymeric chains (polyelectrolytes) and proteins, found in domains such as food engineering, pharmacology, or biology, lead to structures still poorly known. We studied them by Small Angle Neutron Scattering (SANS) and used deuterated polymer and contrast matching in solvents made of heavy water and light water. The protein is the lysozyme (positively charged at $\text{pH} < 11$) and the polyelectrolyte is polystyrene sulfonate (PSS, always negatively charged). The ratio of charges brought ($[-]/[+]$) is an essential parameter. When it is close to 1, two structures can be obtained. One is a gel of PSS crosslinked by the proteins that locally shrink the PSS chains but keep them in an entangled regime (semi-diluted). The other is made of dense globules (radius ~ 10 nm) with a fractal organisation at higher scale where the chains are too short and are in a disentangled regime (diluted) after being shrunk. This structure is very well defined and allows a deeper study: we have shown that the core of the globules has a null charge, that the species in excess in an electrostatic point of view stay in solution, possibly in a shell for the PSS chains, and that their size is fixed by the ionic strength. A specific measurement of the counterions has proved that they are ejected from the core of the complexes during their formation. The conformation of the chains inside the complexes has been measured using an adapted labelling. Finally when $[-]/[+] \gg 1$, a fluid and limpid transient network of proteins denatured by the PSS is obtained.